

A *C. elegans* TRA-1/GLI/Ci szex-determinációs faktor célgénjeinek meghatározása és analízise

Doktori értekezés

Hargitai Balázs



Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar

Biológia Doktori Iskola

Klasszikus és Molekuláris Genetika Doktori Program

A Doktori Iskola vezetője: dr. Erdei Anna akadémikus

Programvezető: dr. Orosz László akadémikus

Témavezető: dr. Vellai Tibor docens

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar

Genetikai Tanszék

Budapest

2009

Tartalomjegyzék

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS	6
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
3.1. A szex-determináció és dóziskompensáció	7
3.1.1. A szex-determináció és dóziskompensáció emlősökben	9
3.1.2. A szomatikus szex-determináció és dóziskompensáció <i>Drosophila melanogaster</i> -ben	11
3.1.3. Szomatikus szex-determináció és dóziskompensáció <i>Caenorhabditis elegans</i> -ban	13
3.2. A Hedgehog jelátviteli rendszer	19
3.2.1. A Hedgehog útvonal komponensei <i>C. elegans</i> -ban	22
3.3. A <i>C. elegans</i> vulvaszövetének kifejlődése	23
3.3.1. A <i>C. elegans</i> vulvafejlődés szabályozása	24
3.3.2. A szintetikus multivulva (<i>synMuv</i>) gének	26
3.3.3. A <i>lin-39/Hox</i> gén szerepe a <i>C. elegans</i> vulvafejlődés során	27
3.4. A sejtfúzió mechanizmusa	28
3.4.1. A sejtfúzió szabályozása <i>C. elegans</i> -ban	30
3.5. A heterotimer G fehérjék által közvetített jelátvitel	31
3.6. A <i>Caenorhabditis elegans</i> általános jellemzése	33
4. CÉLKITŰZÉSEK	35
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	37
5.1. <i>In silico</i> kötőhely analízis	37
5.2. Felhasznált törzsek	37
5.2.1. <i>Escherichia coli</i> törzsek	37
5.2.2. <i>C. elegans</i> törzsek	37
5.3. Törzsfenntartás	38
5.4. RNS interferencia	39
5.4.1. Totál RNS izolálása <i>C. elegans</i> -ból	40
5.4.2. RT-PCR	41
5.4.3. Klónozási lépések	42
5.5. <i>In vitro</i> fehérje termelés	45
5.5.1. DNS tisztítás fenol-kloroform extrakció alkalmazásával	45
5.5.2. <i>In vitro</i> transzkripció és transzláció	46
5.6. EMSA	47
5.6.1. Anellálás	47
5.6.2. α 32P-dCTP jelölés	47
5.6.3. Natív poliakrilamid gélfuttatás, autoradiográfia	48
5.7. Vulvaszám meghatározás	49
5.8. Az embrionális életképesség meghatározása	49
5.9. Transzgének létrehozása	50
5.10. Transzgénikus állatok előállítása	50
6. EREDMÉNYEK	51

6.1. A TRA-1A fehérje transzkripció célpontjainak genom szintű <i>in silico</i> meghatározása..	51
6.2. A TRA-1A transzkripció faktor szabályozza a <i>xol-1</i> gén aktivitását	53
6.2.1. A TRA-1A fehérje kötődik a <i>xol-1</i> gén szabályozó régiójához <i>in vitro</i>	54
6.2.2. A TRA-1A fehérje gátolja a <i>xol-1</i> gén transzkripcióját az XX hermafrodita állatokban	56
6.2.3. A hiperaktív <i>xol-1</i> fenotípus kifejeződése függ a <i>tra-1</i> gén működésétől	60
6.3. A TRA-1A fehérje transzkripcionálisan gátolja a <i>lin-39</i> gént	63
6.3.1. A TRA-1A kötődik a <i>lin-39/Hox</i> gén szabályozó régiójához <i>in vitro</i>	63
6.3.2. A <i>tra-1</i> gén aktivitása befolyásolja a <i>C. elegans</i> vulva mintázatképződését	65
6.3.3. A TRA-1A fehérje a vulva prekursorsejtekben akkumulálódik a vulva indukciót megelőzően és az indukció alatt.....	67
6.3.4. A TRA-1A gátolja a <i>lin-39</i> riporter gén expresszióját a vulva prekursorsejtekben	68
6.3.5. A <i>tra-1</i> gén inaktíválása rendellenes sejtfúziót eredményez a vulva és a hipodermisz fejlődése során	69
6.3.6. A <i>tra-1</i> gén inaktivációja fokozott vulvaindukcióhoz vezet <i>synMuv AB</i> kettős mutáns állatokban	71
6.3.7. A <i>tra-1</i> gén inaktivációja ektopikus vulvaindukciót okoz <i>synMuv A</i> mutáns háttérben	73
6.4. A TRA-1A <i>in vitro</i> kötődik a <i>goa-1</i> gén exoni szekvenciájában található feltételezett kötőhelyhez	75
7. KÖVETKEZTETÉSEK	78
7.1. A TRA-1A transzkripció faktor lehetséges célgénjeinek meghatározása	78
7.1.1. A <i>tra-1</i> és <i>xol-1</i> gének közötti kapcsolat molekuláris vizsgálata	79
7.1.2. A <i>tra-1</i> szerepe a dóziskompenzációban.....	80
7.1.3. A <i>xol-1</i> és <i>tra-1</i> gének közötti genetikai kapcsolat következményei	82
7.1.4. A <i>tra-1</i> és <i>lin-39</i> gének közötti kapcsolat molekuláris vizsgálata.....	84
7.1.5. A <i>tra-1</i> egy <i>synMuv B</i> gén.....	86
8. ÖSSZEFOGLALÁS	88
9. SUMMARY	89
10. FELHASZNÁLT IRODALOM	90
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	103

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AC	Anchor Cell (anchor sejt)
APS	ammónium-perszulfát
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
bp	bázispár
<i>ceh</i>	<i>C. elegans Homeobox</i> gén
Ci	<i>Cubitus interruptus</i> gén
cos2	<i>costal 2</i> gén
DCC	Dosage Compensation Complex (dózisompenzációs komplex)
DEPC	dietil-pirokarbonát
DNS	deoxiribonukleinsav
Dpy	Dumpy (tömszi testalkatú fenotípus)
EDTA	etilén-diamino-tetraecetsav
<i>egl</i>	<i>egg laying defective</i> (embrió lerakásban gátolt) gén
EMSA	Electro Mobility Shift Assay (gélshift kísérlet)
EtOH	etanol
fem	<i>FEMinization</i> (szómát feminizáló) gén
fog	<i>Feminization Of Germline</i> (csíravonalat feminizáló) gén
<i>fox</i>	<i>Feminization On X</i> (X kromoszómán elhelyezkedő feminizáló hatású) gén
<i>Fu</i>	<i>FUsed</i> (füzionált) gén
<i>gf</i>	<i>Gain-of-Function</i> (funkciónyeréses) mutáció vagy allél
GFP	Green Fluorescent Protein (zöld fluoreszcens fehérje)
GLI	GLIoma associated oncogene protein (Glioblasztóma asszociált fehérje)
goa	G protein, O, Alfa alegység
GTP	guanozin-5'-trifoszfát
her	<i>HERmaphrodization of XO animals</i> (az XO hím állatokat hermafroditákká alakító) gén
Hh	Hedgehog
Hh-r	Hedgehog-related (Hh rokon fehérjék)
Him	High Incidence of Males (hímeket nagy százalékban szegregáló fenotípus)
HIV	Human Immunodeficiency Virus (emberi immunhiány-előidéző vírus)
Ihh	Indian Hedgehog fehérje

IPTG	izopropil- β -D- tiogalaktopiranozid
kb	kilobázis
<i>lf</i>	<i>Loss-Of-Function</i> (funkcióvesztékes mutáció vagy allél)
Mab	Male ABnormal (abnormális hím morfológia fenotípus)
Msl	Male Specific Lethal (hím letális)
mtsi.	munkatársai
NaCl	nátrium-klorid
NaOH	nátrium-hidroxid
NGM	Nematode Growth Medium (nematoda tenyésztő médium)
PCR	Polimerase Chain Reaction (polimeráz láncreakció)
Ptc	Patched
PTR	Patched-related (rokon)
Rcf	Relative Centrifugal Force (relatív centrifugális erő)
RNSi	RNS interferencia
RNS	Ribonukleinsav
rpm	Round Per Minute (kör/perc, fordulatszám)
<i>sdc</i>	<i>Sex-determination and Dosage Compensation defect</i> (rendellenes szex-determinációt és dóziskompenzációt okozó) gén
<i>sea</i>	<i>Signal Element on Autosome</i> (autoszómás jel elem) gén
<i>sex</i>	<i>Signal Element on X</i> (X kromoszómás jel elem) gén
Shh	Sonic HedgeHog fehérje
SNARE	Soluble NSF/alpha SNAP receptor (szolubilis NSF és SNAP receptor fehérje)
<i>SRY</i>	<i>Sex-determining Region of the Y chromosome</i> (az Y kromoszóma ivar-meghatározó régiója)
SuFu	Suppressor of fused fehérje
sxl	SeX Lethal (szex letális) fehérje
TBE	Tris/Borát/EDTA. puffer
TE puffer	Tris-EDTA puffer
TEMED	tetrametil-etiléndiamin
tra	TRAnformer (szexuálisan átalakuló)
VPC	Vulval Precursor Cell (vulva prekursorsejt)
Xist	X-Inactive Specific Transcript (X kromoszóma inaktíváló nem-kódoló RNS)
<i>xol</i>	<i>XO Lethal</i> (az XO hím embriók életképtelenek) gén
<i>XSE</i>	<i>X signal element</i> (jel elem az X kromoszómán)

2. BEVEZETÉS

Az állati egyedfejlődés során a Hedgehog (Hh) jelátviteli útvonal alapvető szerepet játszik a sejtnövekedés és differenciáció szabályozásában. Az embrionális mintázatképződést (például a mezodermális eredetű szervek fejlődését) és szöveti homeosztázist szintén a Hh aktivitás kontrollálja. A Hh jelátvitel működését gátló mutációk emlősökben fejlődési rendellenességekhez vezetnek, míg az útvonal ektopikus aktiválása tumorfejlődést indukál. Egyedfejlődési és orvosbiológiai jelentősége ellenére a Hh útvonal által közvetlenül szabályozott úgynevezett effektor célmolekulák kevésbé ismertek.

A fonalféreg *Caenorhabditis elegans*-ban számos Hh és Ptc rokon fehérje található. A *C. elegans* Ci/Gli transzkripciós faktort a *tra-1* gén kódolja, amely a fonalféreg szexdeterminációs kaskád downstream komponense. Az aktív *tra-1* gén a hermafrodita, az inaktív a hím nem kialakulását teszi lehetővé. A szomatikus szex kialakulásának összes aspektusa TRA-1 által szabályozott, ennek ellenére igen keveset tudunk a TRA-1 transzkripciós faktor működéséről, célpontjairól.

A doktori munka célja az eddig ismeretlen, TRA-1 által közvetlenül szabályozott gének meghatározása, tehát a Hh jelátvitel effektor molekuláinak azonosítása volt. Bioinformatikai módszerekkel azonosítottam a *C. elegans* genom azon szakaszait, amelyekhez az endogén TRA-1 fehérje kötődhet. A talált kötőszekvenciák konzerváltsága és pozíciója alapján kiválasztottam azokat a géneket, amelyek esetében valószínűsíthető volt a funkcionális kapcsolat. Ezen gének esetében további biokémiai, sejtteni és genetikai módszerekkel vizsgáltam a TRA-1 fehérje hatását.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A szex-determináció és dóziskompenzáció

A nemi jellegek kialakítása alapvető fontosságú az ivaroson szaporodó élőlények egyedfejlődésében. A váltivarúság viszonylag korán jelent meg az evolúció során és igen elterjedt az élővilágban. Érdekes módon a szexuális fejlődést gyakran eltérő mechanizmusok teszik lehetővé a különböző állati taxonokban. Az ivari determináció különböző mechanizmusai két főbb csoportra oszthatók. A környezeti ivar-determináció esetében a megtermékenyítést követően környezeti faktorok (pl. hőmérséklet) hatására dől el, hogy hím vagy női nemű lesz az állat. A genetikai ivar-meghatározottság esetében már a megtermékenyítéskor eldől az egyed neme. Ennek a folyamatnak az alapvető lépése a zigótában megy végbe, ahol az ivari kromoszómák jelenléte vagy száma alapján megtörténik az úgynevezett kromoszómális szex meghatározása. A továbbiakban a kromoszómális nem szolgál elsődleges jelként a szex-specifikus tulajdonságok kialakításához.

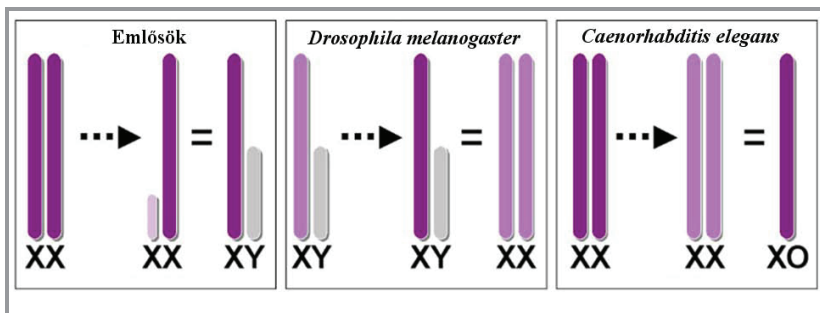
A szex-determináció molekuláris mechanizmusait leginkább az emlősökben, rovarokban és fonálférgekben jellemezték (Meyer, 2005). Noha a szex-determináció célja az 1. ábrán látható fajok mindegyikében a kromoszómális nemnek megfelelő ivari dimorfizmus kialakítása, a folyamatok logikája és mechanizmusa nagymértékben különbözik.

	Emlősök	<i>D.melanogaster</i>	<i>C.elegans</i>
Jel	Y kromoszóma	X:A arány	X:A arány
Jelátvitel	SRY által szabályozott gonád fejlődés	mRNS érést szabályozó kaszkád	szekretált ligand-receptor útvonal

1. ábra. A főbb szomatikus szex-determinációs mechanizmusok. Az emlősök esetében az Y (ivari) kromoszóma megléte vagy hiánya alapján dől el, hogy milyen nemű egyed fejlődik az embrióból. Ezzel szemben az ecetmuslica és a fonálféreg nemét az ivari kromoszómák és az autoszómák számának aránya alakítja ki. (Az egyes mechanizmusok részletei a későbbiekben kerülnek bemutatásra.)

Az emlősökben - így az emberben is - az Y kromoszóma, illetve annak pszeudoautoszomális régiójában található *SRY* (*Sex-determining Region of the Y chromosome*) gén megléte határozza meg a hím nem kialakulást. Ezzel szemben az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) és a fonálférgek esetében az ivari kromoszómák és az autoszómák szettjének számaránya határozza meg az egyed nemi fejlődését (az említett fajokban zajló mechanizmusok részletes bemutatására a későbbiekben kerül sor).

A különböző ivar-determinációs mechanizmusoknak egyetlen közös tulajdonsága van: mindegyik esetben elengedhetetlen az ivari kromoszómákon lokalizált gének dózisének kiegyenlítése, amit dóziskompenzációnak nevezünk. Ez a folyamat biztosítja az ivari kromoszómák géntermékeinek azonos mennyiségét a különböző nemekben. A dóziskompenzáció folyamata is különbözhet az egyes fajokban (2. ábra), de minden esetben



2. ábra. A főbb dóziskompenzációs mechanizmusok. Az emlősök esetében a női sejtek egyik X kromoszómájának inaktivációjával (emberben a keletkezett inaktív kromoszómát Barr-testnek nevezik) valósul meg a dóziskompenzáció. *Drosophilában* a hímek sejtjeiben megduplázódik az X-kapcsolt gének aktivitása, ezáltal kiegyenlítődik az X kromoszómáról átíródó gének dózisa a két nemben. *C. elegans* hermafroditák esetében mindkét X-kromoszómán felére csökken a génaktivitás. Így hasonló géndózis alakul ki, mint ami a hímek egyetlen, teljesen aktív X kromoszómájáról származik.

jelen van egy szabályozó komplex, amely az egyik nemben az ivari kromoszómá(k)hoz kapcsolódik, és a génaktivitás változtatásával szabályozza a gének dózisént (Meyer, 2005). A dóziskompenzáció hiánya a legtöbb fajban szex-specifikus letalitást okoz (Chow és Heard, 2009).

3.1.1. A szex-determináció és dóziskompenzáció emlősökben

Emlősökben a hím a heterokromatikus nem. Ebben a nemben a diploid sejtekben két különböző (XY), míg a női sejtekben két megegyező (XX) ivari kromoszóma található. Aneuploid mutánsok (pl. XXY = hím, vagy XO = nőtény) vizsgálatából derült ki, hogy az emlősök ivar-meghatározásában az Y kromoszóma megléte és nem a kromoszómák számának aránya a meghatározó (Jacobs és Strong, 1959). Az Y kromoszómán találhatók ugyanis az ivardetermináns gének, melyek az alapvetően homokromatikus női fejlődésből a hím jellegek kialakításának irányába irányítják az embriót. Az emlős ivar három szinten értelmezhető. Az elsődleges szint a kromoszómális vagy genetikai szex. Ez az Y kromoszóma meglétét vagy hiányát jelenti a zigótában. Az Y kromoszóma rövid karján található egy ivar-determinációs szerepű gén, az *SRY* (*Sex-determining Region of the Y chromosome*), ami egy herefejlődést elősegítő faktort (*TDF* - *Testis Determining Factor*) kódol (Sinclair és mtsi., 1990). A *SRY* fehérje termelődése az embrionális fejlődés során más faktorokkal, például a *SOX9* (*SRY-box 9*), *WT1* (Wilms *Tumour* 1), *SF1* (*Steroidogenic Factor* 1) és *GATA4* (*GATA-binding protein* 4) fehérjékkel együtt a here kialakulását és ezzel párhuzamosan a hím nemi fejlődést segítik elő. Ezzel szemben a női embriókban a *DAX1* (*Dosage-sensitive sex reversal, Adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1*) és *WNT4* (*Wingless-Type MMTV integration site family, member 4*) gének termékei meggátolják a here fejlődését, illetve elősegítik a petefészkek kialakulást (Zarkower, 2001). Az elsődleges ivarszervek kialakulása, vagyis a hím vagy női gonádális nem kialakulása jelenti a szex másodlagos szintjét, ami megfelel az elsődleges ivari determinációnak is. A harmadik szint a fenotípusos szex (vagy másodlagos ivari differenciáció), amit a here vagy az ovárium által termelt hormonok alakítanak ki. A hím fenotípus kialakulása két tesztikuláris hormon jelenlététől függ. Ezek az AMH (anti-Müller hormon), melyet a here Sertoli sejtei termelnek, illetve a tesztoszteron szteroid hormon, amelyet a magzat Leydig-féle sejtei szekretálnak (Sinisi és mtsi., 2003). A női fejlődésért az ösztrogén hormon felelős, ami a magzati ováriumban termelődik (Brown 1963).

A dóziskompenzáció a női sejtekben az egyik X kromoszóma véletlenszerű inaktiválásával valósul meg, amelynek kialakításáért az X kromoszómákon található *X Inaktivációs Centrum* (*XIC*) felelős (Ballabio és Willard, 1992). Ebben a régióban található a *XIST* (*X-Inactive Specific Transcript*) gén, ami egy 17 kb méretű nem transzlálódó RNS-t kódol. A *XIST* RNS az inaktiválandó X kromoszómáról termelődik, majd cisz helyzetben kapcsolódik a kromatinhoz. Az így kialakított heterokromatikus struktúra fenntartása később a

kromatin kovalens módosításával valósul meg (Brown és mtsi., 1991). Ilyen folyamat lehet a hisztonok deacetilációja, DNS metiláció, H2A hiszton „macroH2A” variánsának feldúsulása, valamint hiszton metilációs és ubiquitinációs helyek kialakítása. Ezek a faktorok represszor fehérjék (például a HP1 - *Heterochromatin Protein-1* - és a Polycomb komplexek) toborzását végzik el (Straub és Becker, 2007). A későbbiekben a heterokromatikus állapot a XIC régióról kiterjed az egész X kromoszómára, csökkentve annak génaktivitását (Heard, 2005). Végül a diploid kromoszóma állományban egyetlen X kromoszóma marad transzkripcionálisan aktív.

Az inaktív X kromoszóma képezi az úgynevezett Barr testet. A Barr test inaktivációja csaknem teljes, mindössze a gének 15%-a tud átíródni. Ezek a gének olyan csoportokba rendeződtek az evolúció során, melyek környezetében a genomi átlagnál alacsonyabb a heterokromatin kiterjedését segítő LINE-1 ismétlődő szekvenciák gyakorisága (Carrel és Willard, 2005). A sejtosztódások során létrejövő utódsejtek öröklik az X kromoszóma inaktív mintázatát. (Lee és Lu, 1999). Mivel a dóziskompenzáció a nőstények fejlődésének korai stádiumában minden egyes sejtben véletlenszerűen történik meg, a kifejtett nőstények teste mozaikos, vagyis olyan sejtek utódainak a keveréke, amelyekben az apai, vagy az anyai



3. ábra. Random X inaktiváció okozta genetikai mozaikosság. A calico szőrszínű (barna és fekete foltok váltakozása) macskák általában nőstények, mivel a mintázat a random X inaktiváció hatására alakul ki.

X inaktiválódott random módon. A nemhez kötött jellegre heterozigóta állatokon észlelhető a mozaikosság. Például a calico macskák szőrzetének színét meghatározó génekre heterozigóta nőtények esetében a különböző X kromoszómák eltérő genotípusának hatására alakul ki a jellegzetes trikolór mintázat (3. ábra) (Thuline és Norby, 1961). Calico szőrszínnel rendelkeznek az XXY hím egyedek is, hiszen bennük is random inaktiválódik az egyik X-kromoszóma. A homozigóta nőtények, illetve a hemizigóta hímek mindig egyszínűek.

3.1.2. A szomatikus szex-determináció és dóziskompenzáció *Drosophila melanogaster*-ben

Drosophila melanogaster-ben a szexuális differenciáció az ivar-specifikus morfológia, fiziológia és viselkedés kialakulását, valamint a szintén ivarfüggő dóziskompenzáció és ivarsejt-fejlődés szabályozását foglalja magában. Mindezek a folyamatok egy kromoszómális jeltől függenek, amely a nőtény és hím egyedek esetében eltérően szabályozza az *Sxl* (*Sex Lethal*) gén aktivitását (Erickson és Cline, 1993).

A szomatikus szex-determináció elsődleges jele a kromoszómális nem, vagyis az X kromoszómák és az autoszómák szettjének számaránya (X:A). Amennyiben ez az arány 1 ($2X:2A=1$) női, ha 0,5 ($1X:2A=0.5$) hím fejlődés fog bekövetkezni (Cline, 1993). Az Y kromoszómának nincs szex-determináns szerepe, de jelenléte elengedhetetlen a hímek fertilitásához (az aneuploid XXY mutáns is nőtény, míg az XO mutáns steril hím). Az X:A arány megállapítása és az *Sxl* gén aktivitásának beállítása sejt-autonóm módon történik meg a korai embrióban még a blasztociszta állapot előtt (Bopp és mtsi., 1991). A szex-determináció sejt-autonómiáját egy ivari mozaik rendszer (az ún. gynanderek) alkalmazásával igazolták (Wieschaus és Gehring, 1976). Ezek az állatok XX és XO sejtekkel is rendelkeznek, ennek köszönhetően női és hím struktúrákat is kialakítanak.

Az X:A jelet kialakító gének három csoportba oszthatók. Az ún. „numerátor” gének az X kromoszómán helyezkednek el, vagyis az XX női sejtekben két kópia található belőlük, míg az XY hím sejtekben csak egy. A numerátorok funkciója az *Sxl* gén aktiválása (Erickson és Cline, 1993). Négy numerátor gént ismertünk, ezek az úgynevezett *sisterless* (*SysA*, *-B*, *-C*) gének és a *runt* (*run*) gén (Duffy és Gergen, 1991; Erickson és Cline, 1993; Deshpande és mtsi., 1995). Az egyetlen ismert „denominátor” gén az autoszómális *deadpan* (*dpn*), amely egy transzkripciósi faktort kódol. A Dpn fehérje gátolja az *Sxl* transzkripcióját (Younger-Shepherd és mtsi., 1992; Barbash és Cline, 1995). A harmadik csoportba anyai hatású gének

tartoznak. A *daughterless* (*da*) és a *hermaphrodite* (*her*) gének termékei pozitívan szabályozzák az *Sxl* transzkripcióját (Cronmiller és mtsi., 1988; Pultz és Baker, 1995). Ezzel szemben az *extramacrochaetae* (*emc*) és *groucho* (*gro*) génk az *Sxl* negatív szabályozói (Younger-Shepherd és mtsi., 1992; Paroush és mtsi., 1994). A nőstényekben kifejeződő aktív SXL fehérje az alternatív mRNS érést szabályozó genetikai útvonalakon keresztül aktiválja a dóziskompenzációt, illetve mindkét nemben szabályozza a szomatikus és ivari szex-determinációt (Bashaw és Baker, 1997; Kelley RL és mtsi., 1997).

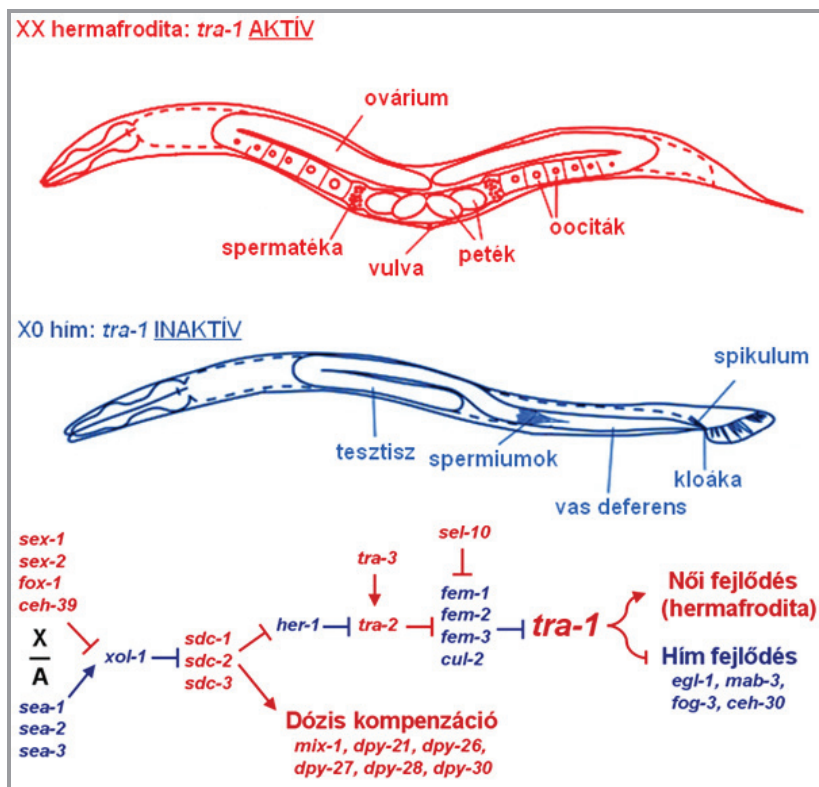
A *tra* (*transformer*) gén a szomatikus ivardetermináció fő szabályozója. Amennyiben az SXL fehérje jelen van (női fejlődés), a teljes hosszúságú TRA fehérje fejeződik ki, ami a *doublesex* (*dsx*) gén nőstény-specifikus átíródását segíti elő (Sosnowski és mtsi., 1989; Hoshijima és mtsi., 1991). Mind a női típusú DSX (DSXF), mind a TRA fehérje hiányában kialakuló hím-specifikus DSXM transzkripció faktor funkcióval bír, és a szexuális differenciációhoz szükséges gének expresszióját szabályozzák (Burtis és Baker, 1989). A DSXM fehérje aktiválja a hím differenciációs faktorokat, valamint represszálja a női fejlődéshez szükséges géneket. Ezzel szemben a DSXF gátolja a hím-specifikus géneket és aktiválja a nőstény-specifikus differenciációt (Pultz és mtsi., 1994). A *Drosophila* szóma legtöbb szexuális jellemzője a *dsx* által szabályozódik, de például a központi idegrendszer csak a *tra* gén aktivitástól függ, a *dsx*-étől nem (Taylor és mtsi., 1994).

Az ecetmuslicák esetében a dóziskompenzáció a hímek egyetlen X kromoszómájának transzkripció hiperaktiválásával valósul meg. Ehhez a folyamathoz az öt *msl* (*Male Specific Lethal* – hím letalitást okozó) gén (*msl-1*, *msl-2*, *msl-3*, *mle* és *mof*) megfelelő működése szükséges (McDowell és mtsi., 1996). Az öt MSL fehérje heteromer komplexet alkot, amely specifikus kötőhelyet felismerve kapcsolódik a hím X kromoszóma több száz pontjához. A komplex kötődése kromatin módosító hatással bír, fokozza a 4-es típusú hiszton fehérje 16. pozíciójú lizinjének acetilációját. Ezt a kromatin jelet (H4K16ac) tartják felelősnek a kromatin struktúra megváltozásáért és az így létrejövő fokozott transzkripcióért (Bone és mtsi., 1994).

Az SXL fehérje valószínűleg két különböző szinten is szabályozza a dóziskompenzációt. A korai embriogenezis során közvetlenül hat az X kromoszómás gének aktivitására, a későbbi fejlődés folyamán viszont közvetetten, az *msl-2* gén poszt-transzkripció módosításával irányítja a dóziskompenzáció működését (Kelley és mtsi., 1995; Merendino és mtsi., 1999).

3.1.3. Szomatikus szex-determináció és dóziskompenzáció *Caenorhabditis elegans*-ban

A vad típusú *C. elegans* populációkban két ivar különböztethető meg, az önmegtermékenyítő hermafrodita és a hím (4. ábra). Azok az embriók, melyek két ivari kromoszómát örökölnek hermafroditákká (XX), amelyek csak egyet, hím állattá (XO)



4. ábra. A *C. elegans* szex-determinációs és dóziskompenzációs génkaskád. A *C. elegans* két nem egyikeként fejlődhet; ezek az önmegtermékenyítő hermafrodita és a hím. Azok az embriók, melyek két X kromoszómát örökölnek (XX) hermafroditák lesznek, amelyek csak egyet (XO) hímmé fejlődnek. A kifejlett állatok ivari dimorfizmusa az úgynevezett globális szex-determinációs génkaskád működésének köszönhető. A feminizáló faktorok pirossal, a hím fejlődést elősegítő faktorok kékkel vannak jelölve. A kaskád gátlási lépésekből épül fel (talpas nyilak), hatása a terminális *tra-1* gén aktivitásán összegződik.

fejlődnek. A hímeke jellemző kariotípus spontán kromoszóma szét-nem-válás (*non-disjunction*) során jöhet létre. A hermafroditák olyan módosult nőstények, melyek a lárvális fejlődésük egy rövid szakaszában spermiumokat is termelnek, amelyekkel később megtermékenyítik petesejtjeiket (Herman, 2006). A hermafrodita állatok gonádjának disztális csúcsain egy aszimmetrikusan osztódó összejpopuláció hozza létre az ivarsejtek elődjeit, melyek a továbbiakban a gonád csúcsától eltávolodva meiózisba jutnak és létrehozzák az ivarsejteket (Kimble és Citterden, 2005). A meiotikus termékek a gonádkarok visszahajlásában jelennek meg elkülönült sejtekként, és a továbbiakban a gonád proximális vége felé haladva mennek keresztül érési folyamatokon. A meiotikus termékekből az L4 lárvastádium végét jelentő vedlésig spermiumok fejlődnek (gonádonként mintegy 150 db). A későbbiekben a felnőtt hermafroditák már csak petesejteket termelnek. A spermiumok a gonád proximális vége és az uterus között elhelyezkedő spermatékákba jutnak és ott tárolódnak (4. ábra). Mivel a később termelődő petesejtek érésük során szintén az uterus irányába haladnak, a megtermékenyítés a petesejt spermatékán történő áthaladásakor történik meg. A zigóta mintegy 2 óráig tartózkodik az uterusban, ezalatt alakul ki körülötte a peteburok. Végül a petét a vulva izomzata juttatja a külvilágba a hermafrodita testéből. A hímek esetében a gaméták ugyanúgy jönnek létre, mint a hermafroditákban, de a hímek egykarú gonádjá csak himivarsejteket termel. A hímek képesek párosodni az önmegtermékenyítő hermafroditákkal, ezáltal új genetikai változatokat tudnak létrehozni. A kopuláció folyamán a vulván keresztül a hermafroditába juttatott spermiumok az uterusból bevándorolnak a spermatékákba, ahonnan kiszorítják a hermafrodita saját spermiumait. Ennek köszönhető, hogy a párzást követően lerakott peték szinte kivétel nélkül hibridek, vagyis a párzás eredményeként létrejövő zigóták fele XX hermafrodita, fele pedig XO hím lesz.

A két ivar közti összes anatómiai, fiziológiai és viselkedésszerű különbség az úgynevezett globális szex-determinációs génkaskád működésének köszönhető (4. ábra). Ez az útvonal köti össze a kariotípust az ivari fenotípussal azáltal, hogy szabályozza a szexuálisan dimorf szövetek fejlődését. Az útvonal két szegmensre osztható: az első (*upstream*) része párhuzamosan szabályozza a dóziskompenzációt és a szex-determinációt, biztosítva ezzel a két folyamat összehangolását. A *her-1* (*hermaphroditization of XO animals*) génnel kezdődő ún. *downstream* szegmens már kizárólag a szex-determinációért felelős. A szex-determinációs útvonal alapvetően egy gátlási lépésekből felépülő génkaskád, aminek hatása a terminális *tra-1* (*transformer*) gén aktiválásán összegződik (Zarkower, 2006).

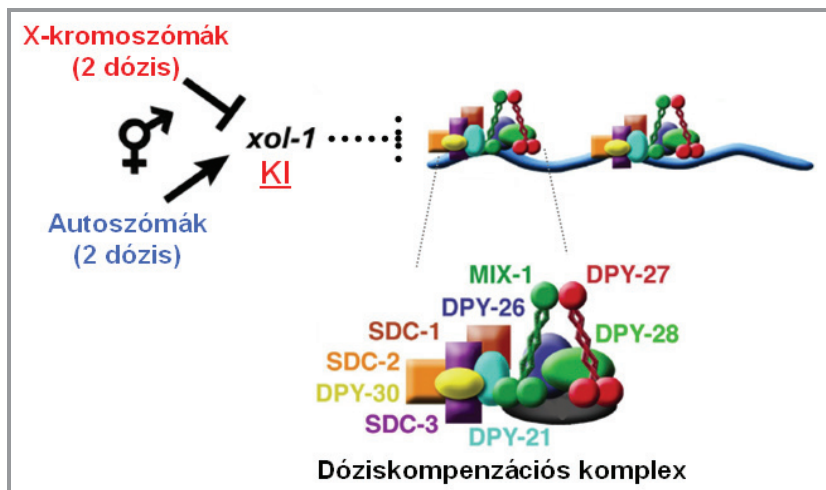
A hermafroditák sejtjei 5 pár autoszóma mellett egy pár X kromoszómával rendelkeznek (XX kariotípus), míg a hímek sejtjei csak egy ivari kromoszómát tartalmaznak

(XO kariotípus) (Meyer, 2004; Zarkower, 2006). A szomatikus szex-determinációs útvonalat egy kromoszómaszámláló mechanizmus indítja be azzal, hogy meghatározza az elsődleges szex-determinációs jelet (Hodgkin, 1987). Ez a jel az ivari kromoszómák és az egyes autoszómák számának aránya, az $X:A$ hányados, ami a hermafroditákban $2X:2A=1$, a hímekben $1X:2A=0,5$. Ez a kromoszóma számláló rendszer nagyon érzékeny; az autoszómák és X kromoszómák számának megváltoztatásával kimutatták, hogy megbízhatóan különbséget tud tenni 0,67 és 0,75 értékek között is (Madl és Herman, 1979). Az $XX:AAA$ (0,67) kariotípusú állatok hímmé, az $XXX:AAAA$ (0,75) kariotípusú állatok hermafroditává fejlődnek. Az $X:A$ arány közvetlenül szabályozza a genetikai kapcsolóként működő *xol-1* (*XO lethal -1*) gén expressziós szintjét (Rhind és mtsi., 1995). Az eddigi ismereteink alapján úgy tűnik, hogy a X kromoszómákon elhelyezkedő „X számláló elemek” (XSEs – *X Signal Elements*), az ún. numerátor gének termékei gátolják a *xol-1* aktivitását, míg az autoszómás számláló elemek (ASEs – *Autosomal Signal Elements*), melyeket az ún. denominátor gének kódolnak, aktiváló hatással bírnak (Nicoll és mtsi., 1997). A szabályozás történhet transzkripcionálisan (pl. a *sex-1* (*Signal Element on X-1*), *ceh-39* (*C. elegans Homeobox-39*) vagy a *sea-1* (*Signal Element on Autosome-1*) és *sea-2* gének esetében), vagy poszt-transzkripció folyamatokon keresztül (pl. a *FOX-1* (*Feminizing gene On X-1*) RNS-kötő fehérje hatásán keresztül (Carmi és mtsi., 1998; Gladden és Meyer, 2007; Powell és mtsi., 2005; Skipper és mtsi., 1999). A *XOL-1* gátolja a dóziskompenzációs komplexet és a szex-determinációs kaszkád első elemét, az autoszómális *her-1* gént. Ennek következtében a szex-determinációs kaszkád a hím fejlődés irányába indítja el a fejlődést. Ha a *xol-1* gátolt, akkor összeáll a dóziskompenzációs komplex, és hermafrodita sorsot kapnak a testi sejtek (Chuang és mtsi., 1996). A *xol-1* aktivitása tehát alapvetően meghatározza a szex-determináció és dóziskompenzáció irányát. A *XOL-1* fehérje strukturálisan a GHMP kis molekulájú kinázokkal mutat rokonságot, melyek metabolikus folyamatokban vesznek részt, azonban *XOL-1* a fehérjecsald többi tagjával ellentétben nem köt ATP-t (Luz és mtsi., 2003).

A *xol-1*-től *downstream* válnak el egymástól a dóziskompenzációért és szex-determinációért felelős útvonalak. A hermafroditákban ugyanis az *sdc* (*Sex Determination and dosage Compensation defective*) gének egyrészt elindítják és fenntartják az X kromoszómák dóziskompenzációját, másrészt ezzel párhuzamosan a szomatikus sejtorsokat is szabályozzák. E gének termékei transzkripcionálisan gátolják a szexdeterminációs kaszkád első *upstream* elemét, a *her-1* gént (Trent és mtsi., 1991). Hímekben az *sdc* gének kifejeződését a *XOL-1* fehérje eddig nem ismert módon gátolja (Meyer, 2005).

A *C. elegans* dóziskompenzáció tehát a hermafrodita állatokban megy végbe (Meyer 2005). A folyamat során a dóziskompenzációs komplex kapcsolódása felére csökkenti mindkét X kromoszóma génexpressziós szintjét, ami biztosítja, hogy az X kromoszóma géntermékeinek dózisa megegyezzen az XX hermafroditák és az XO hímek sejtjeiben. A dóziskompenzáció két lépésben megy végbe. Az első lépésben a dóziskompenzációs komplexek (DCC-k) kötődnek X kromoszómák meghatározott helyeihez, ahol gátolják a transzkripciót. A kötődésüket az úgynevezett *rex* (*Recognition Elements on X*, X-felismerő elemek) helyek teszik lehetővé (Csankovszki és mtsi., 2004). A második lépésben ez a lokális gátlás a szomszédos területekre is kiterjed azáltal, hogy a már kapcsolódott fehérjék további komplexek megkötődését teszik lehetővé (5. ábra). A DCC-k a hermafroditák teljes életideje alatt represszált állapotban tartják az X kromoszómát.

A dóziskompenzációs komplexet alkotó fehérjék génjeinek mutációja XX specifikus letalitást okoz az X kromoszómás gének túlzott mértékű termelődése miatt (Miller és mtsi., 1988). Azok az állatok, amelyek mégis életben maradnak, Dumpy (Dpy, tömzsi test)

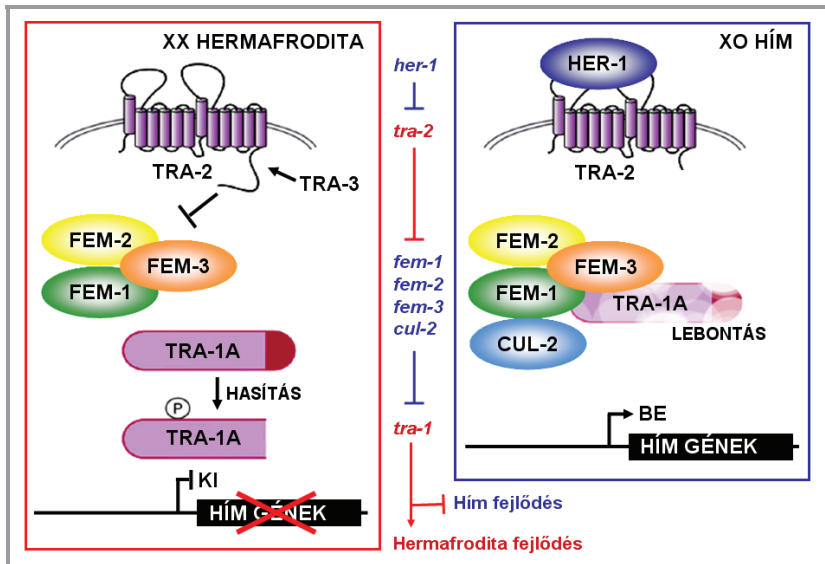


5. ábra. Dóziskompenzáció a *C. elegans* hermifroditákban. XX embriókban az X kromoszómák gátló jele miatt a *xol-1* gén represszált állapotba kerül, ennek köszönhetően a dóziskompenzációs komplex kötődik az X kromoszómákhoz, megfigyelve az azokon található gének aktivitását. Az XO hímekben nem érvényesül a kettős X-dózis, így a *xol-1* gén aktiválódik és meggátolja a dóziskompenzációs komplex működését

fenotípusúak lesznek. A DCC-ket alkotó DPY-26, -27, -28, CAPG-1 (*CAP-G subunit of condensin-1*) és MIX-1 (*mitosis and X-associated-1*) fehérjék hasonlóságot mutatnak a 13S kondenzin komplex tagjaival, amely minden élőlényben fontos szerepet játszik a mitotikus és meiotikus osztódások során (Ford és mtsi.. 2009). A *C. elegans*-ban három különböző kondenzin komplex található (Csankovszki és mtsi., 2008). Ezek a komplexek részben a dóziskompenzációért, részben a mitotikus osztódásért felelősek.

A *her-1* gén szabályozza a szex-determinációs génkaskád *downstream* részét (6. ábra). A HER-1 egy kis szekretált fehérje, ami a him fejlődést segíti elő azáltal, hogy köti a sejtek membránjában elhelyezkedő TRA-2A (TRAnsformer-2A) fehérje extracelluláris doménjét, így gátolva annak működését (Perry és mtsi., 1993). A pontos mechanizmus még nem ismert, de a folyamatban más fehérjék is részt vesznek, mint például a TRA-3 kalcium-függő proteáz, ami TRA-2A megfelelő működéséhez nélkülözhetetlen (Sokol és Kuwabara, 2000). A TRA-2A fehérje aktiválja a FEM (FEMinization) fehérjéket. A FEM fehérjék (FEM-1, FEM-2 és FEM-3) egy diverz fehérjecsaládot alkotnak. A FEM-1 ankirin-domén ismétlődéseket tartalmaz, a FEM-2 egy szerin/treonin fehérje foszfatáz, a FEM-3 pedig szerkezete alapján nem sorolható egyetlen ismert csoportba sem (Spence és mtsi., 1990; Chin-Shang és Spence, 1996). A FEM fehérjék a CUL-2 (CULlin-2) fehérjével együtt egy ubiquitin komplex létrehozására képesek, amely felismeri TRA-1A fehérje N-terminális régióját és lebontja a fehérjét. Abban az esetben viszont, ha a komplex működése gátolt, a TRA-1A fehérjéből C-terminálisan hasított foszfoizozóma keletkezik, ami a sejtmagba jutva transzkripciós faktor aktivitással bír (Schwarzstein és Spence, 2006). A TRA-1A fehérje közvetlenül gátolja a him-specifikus gének expresszióját.

Mint fentebb láttuk, a szomatikus szex-determináció végső soron a *tra-1* gén aktivitásán összegződik (4. ábra). A TRA-1 legfőbb szerepe a női (hermafrodita) nemi fejlődés biztosítása. A neve is innen ered: a *transformer* kifejezés *tra-1* mutáns állatok nemet váltó fenotípusára utal (az XX kariotípusú *tra-1* funkcióvesztéses mutáns állatok him szómát alakítanak ki). A génről két eltérő hosszúságú mRNS képződhet, amelyek cink-ujj doménnel rendelkező fehérjét kódolnak (Zarkower és Hodgkin, 1992). A hosszabb transzkriptum a TRA-1A fehérjét kódolja, amely öt cink-ujj motívummal rendelkezik és szekvencia-specifikus DNS- és RNS-kötésre képes. A rövidebb RNS-ről a TRA-1B fehérje íródik át, amely mindössze két cink-ujj domént tartalmaz és nem képes *in vitro* DNS-kötésre (Zarkower és Hodgkin, 1993). A TRA-1A transzkripciós faktor a him-specifikus gének transzkripcionális gátlása révén hermafrodita fejlődést tesz lehetővé. A TRA-1A transzkripcionális represszor működését írtak le például az *egl-1* (*EGg Laying defective-1*), a



6. ábra. A szexdeterminációs útvonal működése *C. elegans*-ban. Az XX kariotípusú hermafrodita állatokban nem termelődik HER-1 fehérje, így a TRA-2 intracelluláris doménje köti a FEM fehérjéket és gátolja azok működését. A TRA-1A transzkripciósi faktorból hasított foszfoizoforma képződik, ami bejut a sejtmagba és elősegíti a hermafrodita fejlődést a hím-specifikus gének gátlásán keresztül. Az XO himekben a HER-1 gátolja TRA-2-t, így a FEM fehérjék és CUL-2 egy ubiquitin ligáz komplexet alkothatnak, amely degradálja a TRA-1A fehérjét. Ennek köszönhető, hogy a hím gének felszabadulnak a gátlás alól, és az állat hímé fejlődik.

mab-3 (Male ABnormal-3), *fog-3* (Feminization Of Germline-3), *ceh-30* (*C. Elegans* Homeobox-30) és *dmd-3* (DM Domain family-3) gének esetében (Conradt és Horvitz, 1999; Yi és mtsi., 2000; Chen és Ellis, 2000; Schwartz és Horvitz, 2007; Peden és mtsi., 2007; Mason és mtsi., 2008). Ezek a gének a nemi jellegek kialakításában szerepet játszó faktorokat kódolnak, bár funkciójuk igen változatos. Az *egl-1* és *ceh-30* a szex-specifikus sejthalál szabályozásában játszik szerepet, a *dmd-3* és *mab-3* a hímek pároszervének kialakításában, míg a *fog* gének a spermatogenezis folyamatához nélkülözhetetlenek. Említést érdemel, hogy a TRA-1A fehérje nem csak DNS-kötésre képes, hanem szekvencia-specifikusan tud kapcsolódni a *tra-2* mRNS 3' nem-transzlálódó régiójához. Ez a kötődés a molekulák citoplazmába való transzlokációjához vezet (Graves és mtsi., 1999).

A TRA-1 fehérje a GLI (GLIoblasztóma-asszociált) fehérjecsaládba tartozik, amelynek megfelelői a Hedgehog (Hh) jelátviteli útvonal konzervált terminális transzkripció

faktorai. Noha a *Caenorhabditis* fajok esetében még nem írták le az összefüggő Hh jelátviteli jelenlétét, nem a *tra-1* az egyetlen fonálféreg gén, amely Hh útvonal-komponens ortológot kódol (Zugasti és mtsi., 2005).

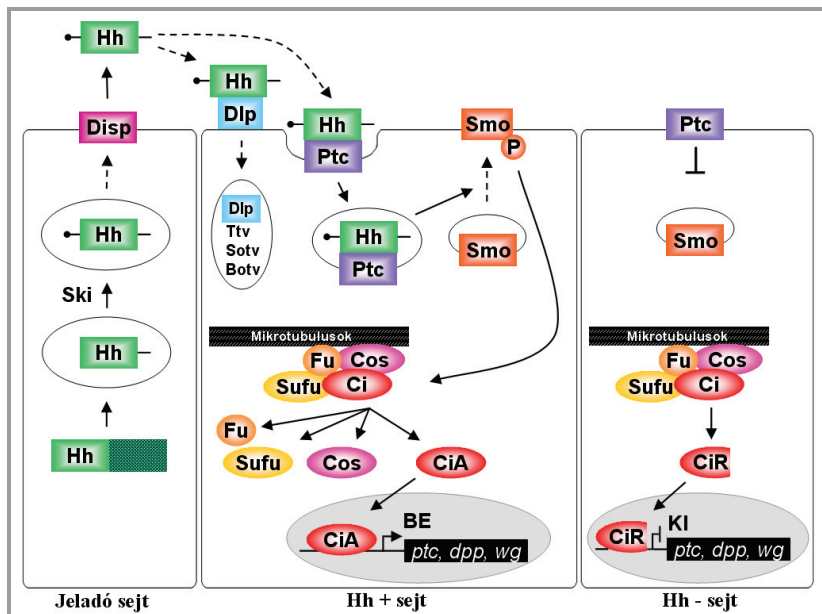
3.2. A Hedgehog jelátviteli rendszer

Az állati szervezeteket felépítő sejtek, szövetek és szervek kialakulását és megfelelő működését evolúciósan konzervált jelátviteli útvonalak szabályozzák. Ezek közül az egyik kiemelkedő jelentőségű a Hedgehog (Hh) jelátviteli rendszer, melynek elemei megtalálhatók az ecetmuslicában és az emberi szervezetben egyaránt (7. ábra) (Ingham és McMahon, 2001). A Hh jelátviteli mechanizmusát először a *Drosophila* embriók szegmentációjának genetikai analízise során írták le (Forbes és mtsi., 1993). További kutatások során fény derült a Hh útvonal alapvető szerepére a gerincesek számos differenciálódási és szervfejlődési folyamatának esetében is (Ingham és McMahon, 2001). A humán Hh jelátviteli abnormális működése számos ráktípus és fejlődési rendellenesség okozója (Evangelista és mtsi., 2006). Konstitutív Hh jelátvitelt okozó mutációk Gorlin szindómához, bazálsejtes karcinómához és medulloblastómához vezethetnek, míg a jelátviteli csökkent működése sporadikus bőr-, agy-, tüdő-, prosztata-, hasnyálmirigy- és gasztrointesztinális daganatok kifejlődését okozhatja (Rubin és de Sauvage, 2006).

Az ecetmuslicák esetében leírt Hh morfogén fehérje szerepe a sejtek közötti jelátvitel. Egerekben és emberben is három Hh-rokon fehérjét írtak le, ezek a Dhh (Desert HedgeHog), az Ihh (Indian HedgeHog) és az Shh (Sonic HedgeHog) (Marigo és mtsi., 1995). Ezek a fehérjék különböző szövetspecifitással bírnak, illetve expressziójuk a fejlődés során időben is eltér, működésük mégis hasonló, mivel midannyian szekretált ligandként szabályozzák a különböző célsejtek sejsorsát, proliferációját vagy túlélését (McMahon és mtsi., 2003). A ligand szekréciója a Disp (Dispatched) fehérje által szabályozódik, ebben a folyamatban szerepet kapnak még egyes heparán-szulfát proteoglikánok is (Dally és Dally-like fehérjék), melyek a Hh fehérje sejtek közötti terjedésében is nélkülözhetetlenek (Glise és mtsi., 2005). A Hh ligand a donor sejt Patched (Ptc/Ptch) membránfehérjén keresztül indítja be a jelátviteli útvonalat (Marigo és mtsi., 1996). A Ptc egy 12-transzmembrán, szterol-érzékeny domént tartalmazó receptor, amely Hh hiányában gátolja a Smo (Smoothered) működését és ezáltal megakadályozza a jelátviteli aktiválódását (Alcedo és mtsi., 1996). Sokáig úgy tűnt, hogy a Hh közvetlenül kapcsolódik a Ptc-hez, a legújabb modellek szerint azonban a kölcsönhatás

kialakulásához ko-receptorok szükségesek, melyek mind a Hh ligand mind a Ptc kötésére képesek. Ilyen tulajdonsággal bírnak például az Ihog (*Interference Hedgehog*)/CDO (*Cell adhesion molecule Down-regulated by Oncogenes*) és a Boi (*Brother Of Ihog*)/BOC (*Brother Of Cdo precursor*) fehérjék (Wilson és Chuang, 2006). A Ptc és Hh interakciójának következtében a Ptc internalizálódik, és ezáltal aktiválódik a Smo. A Ptc nem közvetlenül köti Smo-t, ha azonban jelen van a Hh fehérje, a Ptc gátló hatása megszűnik. Kimutatták az oxiszterol szerepét is a folyamat során, ami vagy a Ptc-t gátolja, vagy intermedierként szolgál a Ptc és Smo között, stabilizálva a Smo aktív állapotát (Rohatgi és Scott, 2007).

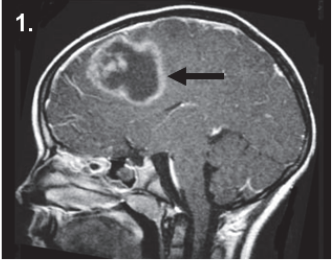
Amennyiben a Hh jelátvitel gátolt, vagyis a Smo inaktív állapotban van, a HSC (*Hedgehog Signalling Complex*) fehérjekomplex a mikrotubulusokhoz vagy intracelluláris vezikulumokhoz kapcsolódik (Zhu és mtsi., 2003). Ebben az esetben a teljes hosszúságú Ci (155 kD) fehérje nem képes bejutni a magba, mivel kötődik a Cos2 és a Sufu fehérjékhez. A



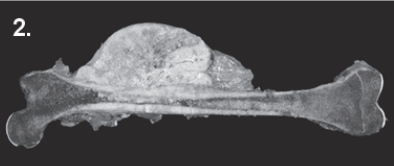
7. ábra. A Hh jelátviteli rendszer *Drosophila melanogaster*-ben. A Hh morfogén a Ptc receptorhoz kötődve aktiválja a jelátvitelt. Az útvonal effektor komponense a Ci/GLI transzkripciós faktor, amely az útvonal célgénjeinek (pl. *ptc*, *dpp* és *wg*) kifejeződését szabályozza. Az ábrán látható fehérjék szerepéről a szövegben található bővebb információ.

Ci fehérje-populáció egy kisebb hányada proteolitikusan hasítódik, aminek eredménye egy 75 kD-os represszor fehérje (CiR). A hasított forma foszforilálódik és bejut a sejtmagba, ahol gátolja a célgénjeinek expresszióját (Zhang és mtsi., 2005). Abban az esetben, ha jelen van a Hh ligand, a Ptc nem képes gátolni Smo-t, ezáltal a HSC felszabadul a mikrotubulosokról, ennek következtében pedig nem hasítódik a transzkripciós faktor. Az aktív Ci (CiA) végül bejut a sejtmagba, ahol transzkripciós aktivátorként hat (7. ábra).

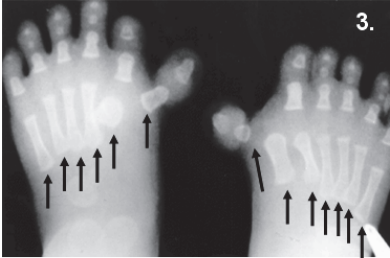
Gén	Betegség
GLI1	Glioblasztóma (1) Rabdomiosarkóma Osteoszarkóma (2) B sejtes limfóma Bazál sejtes karcinóma
GLI2	Ismeretlen
GLI3	Greig cefalo-poliszindaktília szindróma (3) Pallister-Hall szindróma (4) Poszt-axiális polidaktília A és A/B típus Pre-axiális polidaktília IV.




1.



2.



3.



4.

8. ábra. A humán GLI fehérjéket kódoló gének rendellenes működése számos betegség forrása lehet. Az 1. panelen *Glil* mutáció okozta glioblasztóma képe látható. A 2. panel oszteoszarkómás elváltozást ábrázol. A 3. és a 4. panelek az abnormális GLI-funkciók okozta fejlődési rendelleneségek enyhébb megjelenési formáit mutatják be.

Az ecetmuslica és gerinces Hh jelátvitel között a legfőbb különbség, hogy a Smo fehérjék eltérően foszforilálódnak, illetve esetenként más intermediereken keresztül szabályozzák a jelátvitel transzkripciós faktorait (Østerlund és Kogerman, 2006). Ezen kívül emlősökben a Fu és Sufu homológok működésében is jelentős különbségeket találtak (Hooper és Scott, 2005). A gerincesekben új faktorokat is azonosítottak, melyek funkciója még nem lett leírva ecetmuslicában. Ilyen például egy aktin kötő fehérje, a MIM (Missing In Metastasis), vagy megalin - amely egy az SHH kötésére képes receptor - vagy az iguána nevű cink-ujj fehérje, amely a GLI transzkripciós faktorok sejtmagi lokalizációját szabályozza (Hooper és Scott, 2005).

További különbség, hogy míg *Drosophila melanogaster*-ben a Hh jelátvitel által kiváltott összes transzkripcionális választ a Ci fehérje működése kontrollálja, addig gerincesekben legalább három Gli (GLIoblasztóma-asszociált onkogén) gén kódolja a transzkripciós faktor ortológjait. Ezek a Ci-vel erős homológiát mutató, 5 C2-H2-típusú cink-ujj domént tartalmazó transzkripciós faktorok, melyekről kimutatták, hogy a 'GACCACCCA' konszenzus szekvencia kötésére képesek (Kasper és mtsi., 2006). A Gli1 fehérjét erős aktivátorként írták le békák, halak, egerek és emberek esetében, a Gli2 esetében aktivátor és represszor funkciót is azonosítottak, míg a Gli3 fehérjét többnyire represszor hatásúnak tartják (von Mering és Basler, 1999). A Gli fehérjék aktivitása a poszttranszlációs módosításoktól függ, a teljes méretű fehérjék aktivátorként működnek, míg a represszor hatást a C-terminálisan hasított Gli2 fehérje, illetve a proteaszóma által módosított Gli3 fehérje esetében tudták kimutatni (Altaba és mtsi., 2007). Emberben a három GLI fehérjét kódoló gén rendellenes működése számos betegség forrása lehet (8. ábra).

3.2.1. A Hedgehog útvonal komponensei *C. elegans*-ban

Noha a *C. elegans* esetében eddig még nem sikerült igazolni egy összefüggő Hh jelátviteli útvonal meglétét, több kulcsfontosságú konzervált Hh faktort jelenlétét kimutatták már ebben a rendszerben is (1. táblázat) (Zugasti és mtsi., 2005). Jelen vannak például az úgynevezett Hhr (*HedgeHog-Related*) fehérjék, amelyek rendelkeznek a Hh fehérjék jellegzetes doménszerkezetének egyes elemeivel (Bürglin és Kuwabara, 2005). Azonosítottak továbbá több Ptc és a Ptc-hez hasonló Ptr (PTc-Related) fehérjekódoló gént, amelyek szerepét a lárvális vedlések és a kutikulaképzés folyamataihoz szükséges membrán transzport transzportfolyamatokban mutatták ki (Zugasti és mtsi., 2005). Érdekes módon a Hh jelátvitel

	<i>Drosophila melanogaster</i>	Emlősök	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Ligand	Hh	SHH, DHH, IHH	QUA-1, WRT-1-10, GRD-1-17, GRL-1-32, HOG-1
Acil-transzferáz	Rasp	SKN/HHAT	HHAT-1, HHAT-2
Maturáz	Disp	DISPA	CHE-14, PTD-2
Receptor	Ptc	PTC1, PTC2	PTC-1, PTC-3, PTR-1-23, DAF-6
Glipikán	Dlp	?	GPN-1
Egyéb Hh-kötő faktor	Shf, Pxb	HIP, GAS1, megalin/LRP2	PHG-1, LRP-1
Iniciátor	Smo	SMO	-
Smo szabályozó	PKA, CKI, GSK3B	B-arrestin-2, GRK2	ARR-1, GRK-2
Citoplazmatikus jeltovábbító	Cos2, Fu, Sufu	KIF7, KIF3a, IFT88, IFT172, Rab23, MIM/BEG4, FKPB8, SIL, FU(?), SUFU, iguana	-
Transzkripció faktor	Ci	GLI1, GLI2 és GLI3	TRA-1

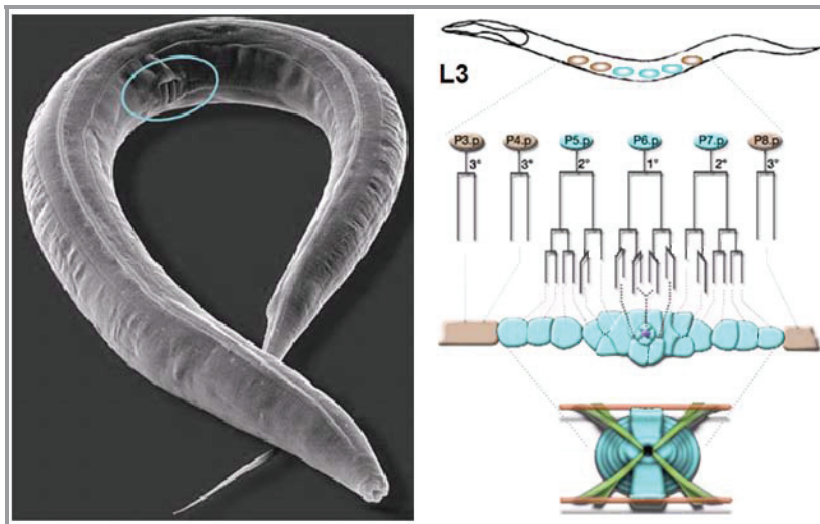
1. táblázat. A Hh jelátvitel komponensek *Drosophilában*, *humánban* és *C. elegans-ban*. A *C. elegans* genom számos Hh komponens kódol, ennek ellenére a fonálféregben még nem ismert az összefüggő Hh jelátvitel.

több komponense hiányzik *C. elegans*-ból. Például nincsenek jelen a Smo, Cos2 és Sufu fehérjék ortológjai, melyek a rovarokban és gerincesekben megismert Hh szignalizáció fontos elemei (1. táblázat) (Bürglin és Kuwabara, 2006).

C. elegans-ban a *tra-1* gén kódolja az egyedüli GLI típusú transzkripció faktor (Zarkower és Hodgkin, 1992). A TRA-1 fehérje - az előző fejezetben bemutatottak alapján - az ivar-specifikus fejlődést szabályozza. A TRA-1 a szex-determinációs génkaskád effektor molekulájaként a hím-specifikus farki struktúra kialakításában (Yi és mtsi., 2000; Mason és mtsi., 2008) és hermafroditákban bizonyos sejtek apoptózisának szabályozásában vesz részt (Conradt és Horvitz, 1999). Meglepő módon semmilyen ismeretünk sincs azzal a kézenfekvő feltevéssel kapcsolatban, hogy a szex-determinációs génkaskádnak a hermafrodita fejlődés során szerepe lenne-e az egyik legjellegzetesebb hermafrodita szerv, a vulva morfogenezisének szabályozásában.

3.3. A *C. elegans* vulvaszövetének kifejlődése

A hermafrodita fonálféreg vulvafejlődése jelenleg a fejlődésbiológia egyik legjobban megismert mintázatképződési, illetve szervfejlődési modellje. Részleteiben ismert, hogy a különböző jelátviteli útvonalak hatására hogyan alakul ki néhány sejtből a funkcióképes, megtermékenyítésre és peterakásra képes vulvaszövet (Sternberg, 2005). A vulva kifejlődése



9. ábra. A *C. elegans* vulva fejlődése. A bal oldali képen egy kifejlett hermafrodita vulvaszöveve látható. A jobb oldali rajzok a vulva fejlődését mutatják, amely lárvális vulva prekurzorsejtekből (VPC-k) indul ki. Hat VPC található a test ventrális részén, de közülük csak három (kékkel jelölve) vesz részt ténylegesen a vulvaszövet kialakításában. Ez a hat sejt három különböző vulva sejtorsot képes kialakítani a különböző jelátviteli útvonalak hatására: elsődleges, másodlagos és nem indukált harmadlagos sejt típusokat. A vulvaképzés folyamata osztódási-, pozicionálási- és fúziós lépésekből épül fel. A jobb oldali sémán látható, hogy az L3 lárvát hat VPC-je hogyan alakítja ki a felnőtt vulvát (Sternberg, 2005). L3: a korai L3 lárvastádiumot jelöli.

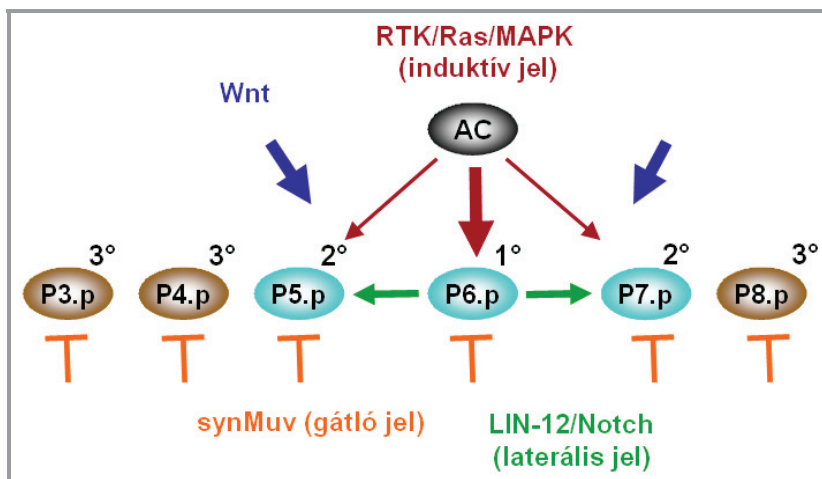
hat, úgynevezett vulva prekurzorsejtből (VPC-k vagy P3.p - P8.p) indul ki a test középső részének ventrális régiójában az L3 stádiumú lárvális fejlődés során (Sternberg és Horvitz, 1986). Ez a hat sejt három különböző sejtors (1°, elsődleges; 2°, másodlagos; 3°, harmadlagos) egyikét követve differenciálódhat az egyedfejlődés folyamán. Azok a VPC-k, melyek elsődleges vagy másodlagos sorsot kapnak, többször osztódnak és kialakítják a leendő vulvaszövetet, míg azok a sejtek, amelyekben harmadlagos sejtors differenciálódik, csak egyszer osztódnak, azután fuzionálnak a hipodermális szincíciummal (9. ábra).

3.3.1. A *C. elegans* vulvafejődés szabályozása

A vulva kialakulása több jelátviteli útvonal összehangolt működésének eredménye (10. ábra). A vulva mintázatképzése egy indukzív jellel indul. Az indukzív jelet (egy

növekedési faktor) a gonád „Anchor” sejtje (AC) szekretálja az L3 lárvastádium elején. Az AC a P6.p felett található. Az induktív jel az RTK/Ras/MAPK (Receptor Tirozin Kinase/Ras/Mitogén-Aktívált Protein Kináz) jelátviteli rendszert aktiválja a három térben legközelebb elhelyezkedő VPC-ben [P(5-7).p] (Sternberg és Horvitz, 1986). Ennek hatására a P(5-7).p sejtek potenciálisan elsődleges vulvasejtsortot nyernek. Ras jel hiányában a vulvafejlődés elmarad (egyik VPC sem indukálódik), és ennek következtében a hermafroditákban nem alakul ki vulvaszövet. Az állat ebben az esetben *Vulvaless* (Vul) fenotípusú lesz. Ezzel szemben hiperaktív Ras hatására (például Ras funkciónyeréssel mutánsokban) azok a VPC-k is indukálódnak, amelyek normálisan nem vesznek részt a vulva indukcióban [P(3,4,8).p], és ez több vulvainagináció eredményez, amely ún. *Multivulva* (Muv) fenotípus kialakulásához vezethet.

A P6.p sejt egy ún. laterális jelet bocsát ki, amely a LIN-12/Notch út vonalat aktiválja a két szomszédos aktivált sejtben (P5.p és P7.p), így jelölve ki azok másodlagos sejtsorsát

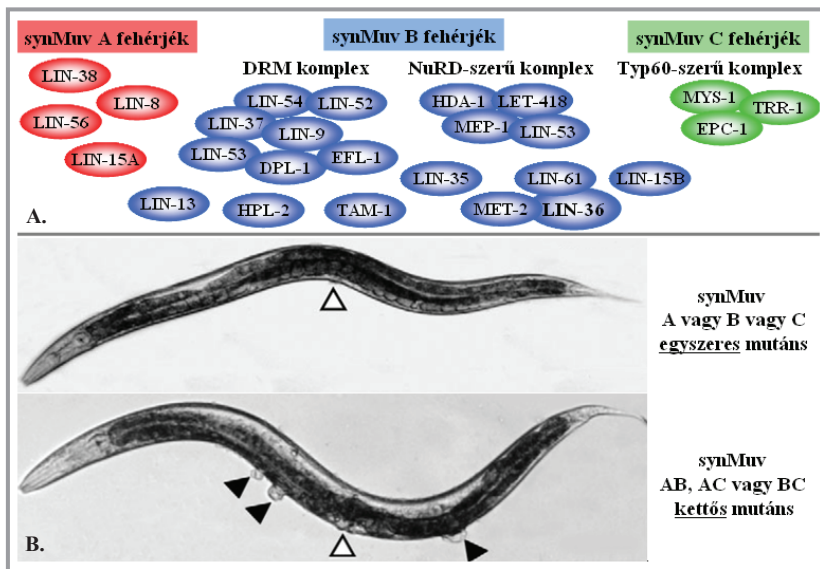


10. ábra. A *C. elegans* vulva prekursorsejtjei [VPC-k vagy P(3-8).p] sorsát szabályozó jelátviteli útvonalak. Az Anchor sejt (AC) által kibocsátott induktív jel aktiválja a RTK/Ras/MAPK jelátvitelt a három legközelebbi VPC-ben [P(5-7).p]. A legerősebb induktív jelet kapó P6.p sejt a laterális Notch jel indukálásával biztosítja, hogy a két szomszédos aktiválódott sejt [P(5,7).p] másodlagos vulva sejtsortot nyerjen. A Ras jellel (barna nyíl) parallel ható kanonikus Wingless jelátvitel (kék nyilak) szintén aktiváló hatása. A hipodermiszből érkező SynMuv jel (narancs színű tlpas nyilak) gátolja a vulvasejtek indukcióját.

(Greenwald és mtsi., 1983; Berset és mtsi., 2001). A LIN-12/Notch jel hiányában a három centrális VPC [P(5-7).p] egyaránt elsődleges vulvasejtsorsort alakít ki, amely kitüremkedő vulva (Protruded Vulva vagy Pvl) fenotípusban nyilvánul meg. A kanonikus Wingless útvonal szintén aktiváló hatása a VPC-kben (Gleason és mtsi., 2002). Hiperaktivitása képes kompenzálni a Ras mutánsokban elmaradó vulvafejlődést.

3.3.2. A szintetikus multivulva (*synMuv*) gének

A vulvafejlődés során az ún. szintetikus multivulva (*synMuv*; *synthetic Multivulva*) gének hatása antagonizál az induktív jellel (Ras) (Cui és mtsi., 2006). A *synMuv* gének három redundánsan működő útvonalba rendeződtek; ezek a *synMuv A*, *B* és *C* genetikai útvonalak.

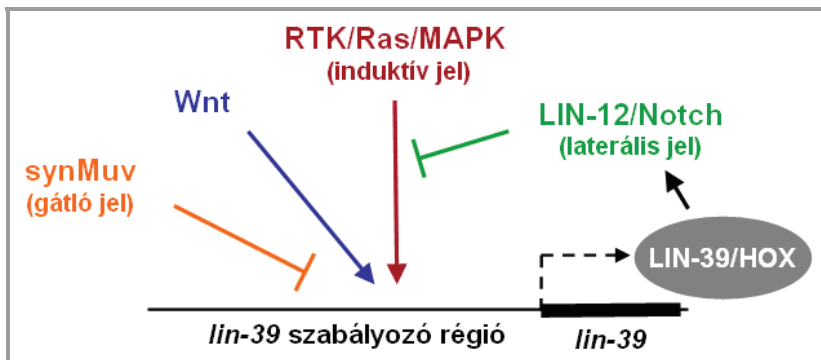


11. ábra A *C. elegans synMuv* gének három funkcionálisan redundáns osztályt alkotnak. A; Az egyes osztályok tagjai között számos kromatin szabályozó faktor található. B; Két különböző *synMuv* osztályba tartozó gén funkcióvesztéses mutációja szintetikus Multivulva fenotípust eredményez (az ektopikus vulva kitüremkedéseket fekete nyílhegyek jelzik a B panelen; a normál vulva struktúráját fehér nyílak jelzik). Az egyszeres *synMuv* mutánsok vad típusú vulvával rendelkeznek.

Bármely egyedi *synMuv* útvonal aktivitásának hiánya nem befolyásolja a vulva fejlődését (vad típusú vulva morfológia), de bármelyik kettő együttes hiánya a vulva indukció fokozódását eredményezi, amely Multivulva fenotípusban nyilvánul meg (11. ábra) (Ceol és Horvitz, 2001). *synMuv AB*, *synMuv AC* és *synMuv BC* kettős mutáns hermafroditák tehát *Muv* fenotípusúak. Számos *synMuv* génről mutatták ki, hogy a kromatin struktúra kialakításában, módosításában játszanak szerepet (Ceol és Horvitz, 2004; Fay és Yochem, 2007; Harrison és mtsi., 2006). A kromatin szerkezeti átrendeződésének (nukleoszóma *remodelling*) folyamatában egyrészt hiszton módosítást (metiláció, acetiláció, foszforiláció vagy szumoiláció) létrehozó, illetve kialakító enzimek vesznek részt, másrészt több olyan faktor is szerepet kap, melyek közvetlen transzkripcióis represszor hatásúak. *SynMuv* gén például a hiszton acetil-transzferázt kódoló *hat-1* (*Histone Acetyl-Transferase – 1*) gén, valamint a *let-418* (*LEThal- 418*), amely a NuRD (*NUcleosome Remodeling and histone Deacetylase*) komplexbe tartozó Mi-2/CHD3 hiszton deacetiláz *C. elegans* homológja (von Zelewsky és mtsi., 2000). Ide sorolható továbbá a retinoblasztóma (Rb) fehérje ortológját kódoló *lin-35* (*abnormal cell LINEage – 35*), vagy az E2F/DP komplex fonálféreg megfelelői, az *efl-1* (*E2F-Like – 1*) és *dpl-1* (*DP-Like - 1*) gének (11. ábra) (Solari és Ahringer, 2000; Unhavaithaya és mtsi., 2002; Myers és Greenwald, 2005; Ceol és Horvitz, 2001).

3.3.3. A *lin-39/Hox* gén szerepe a *C. elegans* vulvafejlődés során

Egyre több kísérletes bizonyíték látszik igazolni azt a feltevést, hogy a vulva sejtorsókat szabályozó jelátviteli rendszerek a *lin-39* (*abnormal cell LINEage-39*) *Hox* gén promóterén integrálódnak (12. ábra) (Maloof és Kenyon, 1998; Guerry és mtsi., 2007; Takács-Vellai és mtsi., 2007). A *C. elegans lin-39* génje egy homeodoménnel rendelkező konzervált transzkripcióis faktort (HOX fehérje) kódol, melynek *Drosophila* homológjai a *Deformed* illetve *Sex combs reduced*, míg humán megfelelője a *HoxB1* (Clark és mtsi., 1993; Wang és mtsi., 1993). A LIN-39 fehérje a fonálféreg testének középső részén található sejtípusok kialakulásáért felelős, szerepe nélkülözhetetlen a vulvafejlődés megfelelő szabályozásához (Maloof és Kenyon, 1998; Alper és Kimble, 2002). A poszt embrionális fejlődés folyamán a *lin-39* szabályozza a VPC-k és a ventrális idegkötég neuronjainak mintázatképzését, sejt-autonóm módon befolyásolja egyes neuroblasztok migrációját, valamint közvetlenül irányít egyes, a vulvafejlődés során rendkívüli fontossággal bíró sejt-fúziós folyamatokat (Wagmaister és mtsi., 2006; Sengupta és Bargmann, 1996; Shemer



12. ábra. A vulva prekurzor-sejtek (VPC-k) sorsát szabályozó jelátviteli útvonalak hatásai a *lin-39/Hox* gén promóterén konvergálnak. A Ras, Wnt és SynMuv útvonalak által közvetített szabályozási folyamatok a *lin-39* VPC-specifikus expresszióját szabályozzák a vulvafejlődés során, a LIN-39 fehérje pedig közvetlenül hat a Notch jelátvitelre a *lin-12* gén expressziójának szabályozásán keresztül.

és Podbilewicz, 2002). Ennek fényében elmondható, hogy a LIN-39 fehérje a *C. elegans* vulvafejlődés központi szabályozó faktora.

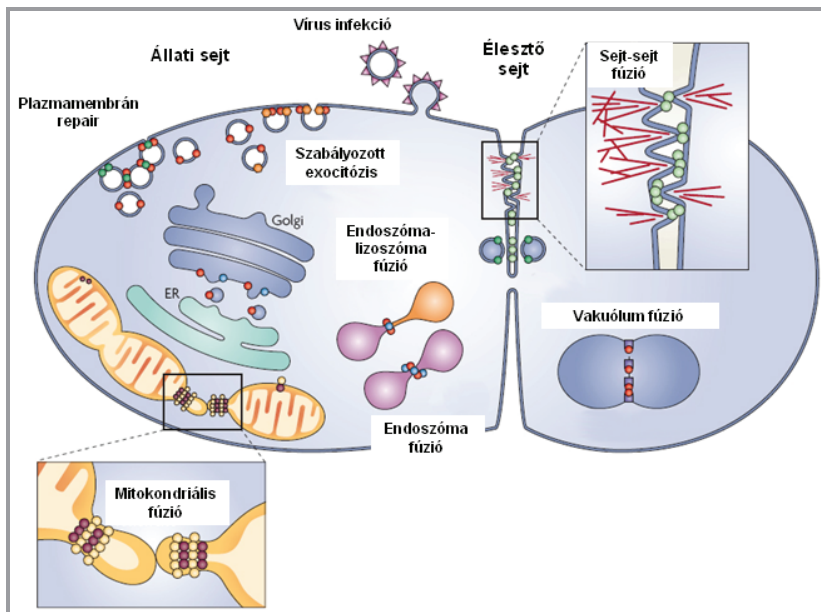
3.4. A sejtfúzió mechanizmusa

Az élőlények testének alapvető funkcionális egységei a sejtek. Az egyes sejteket kétrétegű lipid-alapú plazmamembrán határolja el a környezettől. Egyes biológiai folyamatok során a sejtek képesek összeolvadni membránjaik egyesítésével, létrehozva ezzel egy tágabb kompartmentet, az úgynevezett szincíciumot. Ez a folyamatot nevezzük sejtfúzióknak. A fúzió eredményeként létrejövő többsejtmagvú szincíciumok esszenciális szöveti struktúrák alapjául szolgálnak, így a folyamat alapvető jelentőséggel bír a szervfejlődés és reprodukció folyamataiban. Az emberi szervezetben például sejtfúziós események során alakul ki a teljes izomrendszer, a szemlencse, a placenta nagyrésze, a csontok, illetve a vér fontos alkotóelemei (Chen és Olson, 2004; Hickey és mtsi., 2002; Kuszak és mtsi., 1985; Terada és mtsi., 2002; Ying és mtsi., 2002). A sejtfúzió az ivaros szaporodás folyamatában is nélkülözhetetlen, elég csak a megtermékenyítés során összeolvadó ivarsejtekre gondolni (Xu és Sternberg, 2003). Egyes sejtek inváziószerű viselkedése is fúzióval valósul meg. Ez utóbbira példa a vírusok

(például a HIV) által indukált sejtfüzió, vagy a *C. elegans* úgynevezett *Anchor* sejtjének inváziója és fúziója (Earp és mtsi., 2005; Newman és mtsi., 1996). A közelmúltban vált ismertté a sejtek fúziójának szerepe az őssejtek differenciációjában is (Wagers és Weismann, 2004).

Két sejt fúziójának folyamata az alapvetően hasonló mechanizmus ellenére is jól elkülöníthető az intracelluláris membránok egyesülésének, a szinaptikus vezikulák fúziójának, a mitokondriális fúzió, és az úgynevezett virális fúzió (a vírus egyesülése a gazdasejttel) folyamataitól (13. ábra).

A virális fúzió kiterjedt vizsgálata során különböző vírusok burkában számos fuzogén fehérjét azonosítottak, melyek a gazdasejt és a hozzá kapcsolódó vírus membránjának összeolvadását irányítják. Ezek a fehérjék hidat képeznek a lipid kettősréteg között azért, hogy a gazdasejt felszínéhez közel kerülve a hidrofób N-terminális doménjükkel csatlakoznak a célmembránhoz, majd trimerizálódva konformációváltozáson mennek keresztül, ami végül



13. ábra. A sejtben belüli és sejtek közötti membrán-egyesítéssel járó fúziós folyamatok. A kép bal oldali részén az állati, a jobb oldali részén pedig az élesztő sejtek esetében megismert fúziós események fontosabb példái láthatók.

összehúzza és egybenyítja a membránokat (Harrison, 2008). A virális fúziót tehát alapvetően a vírus burkában található glikoproteinek irányítják (13. ábra).

Az intracelluláris membránfúzió a vírusokhoz hasonlóan α -hélix struktúrájú fehérjék közvetítésével zajlik, a mechanizmus is sokban hasonlít a vírusoknál leírtakéra (Chernomordik és Kozlov, 2008). A különböző sejtorganellek azonban egyedi Ras GTP-ázokat (Rab) hordoznak. Ezek a fehérjék alapozzák meg két organellem egyesülésének feltételeit azáltal, hogy megteremtik közöttük a fúziós fehérjék működéséhez szükséges mikrokörnyezetet. A SNARE (Szolubilis NSF/alfa SNAP receptor) fehérjék a Rab fehérjéknek köszönhetően kerülnek transz helyzetbe, amikor a fehérjék a transzmembrán doménjeik révén egyidejűleg mindkét organellem membránjába beágyazódnak. A transz SNARE komplexek más fehérjék segítségével (pl. SM proteinek, komplexin, HOPS, szinapszisok esetében szinaptotagmin) nyitják össze a kettős membránokat (Wickner és Scheckman, 2008; Chernomordik és Kozlov, 2008).

A mitokondriumok fúziója teljesen egyedi, hiszen ezek a sejtszervecskék kettős membránszerkezettel bírnak. Fúziójuk során először a külső, majd a belső lipid kettősréteg egyesítése történik meg. A folyamatot az előzőekben megismertektől különálló rendszer irányítja (13. ábra) (Wickner és Scheckman, 2008).

A két különálló sejt egyesülése, az úgynevezett sejt-sejt fúzió folyamata egyelőre kevésbé ismert. Az azonban már világossá vált, hogy a folyamatban résztvevő fehérjék nem azonosak sem a virális, sem az intracelluláris fúziók során leírtakkal (Chen és mtsi., 2007).

3.4.1. A sejt-fúzió szabályozása *C. elegans*-ban

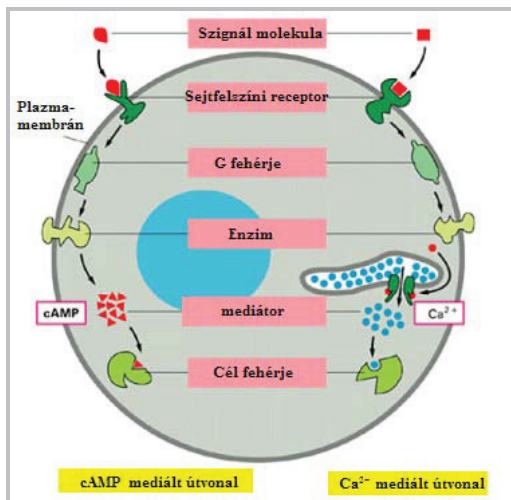
A *C. elegans* egyedfejlődése során kialakuló 1090 szomatikus sejt közül 300 esetben következik be invariáns sejt-fúzió (Hedgecock és White, 1985). Ezek következtében alakulnak ki a szincíciumok az állat testében. Ilyen például az állat kétoldalán húzódó a hipodermális „seam”-sejtek által alkotott, a kutikula felépítését végző úgynevezett *hyp7* szincícium. Emellett számos más szerv, mint pl. a garat, az uterusz vagy a vulva fejlődésében is szerepet játszik a sejt-fúzió (Alper és Podbilewicz, 2008).

Az EFF-1 (*Epithelial Fusion Failure*-1) fehérje fuzogén szerepe központi jelentőségű a *C. elegans* sejt-fúzió során (Shemer és mtsi., 2004). Ismert az is, hogy az *eff-1* transzkripcionálisan szabályozódik több *Hox* gén, így a *lin-39* gén által (Shemer és mtsi.,

2004). Hogy ez a fuzogén fehérje hogyan és milyen ko-faktorok segítségével járul hozzá az akár heterológ sejtek membránfúziójának többlépcsős folyamatához, még felfedezésre vár.

3.5. A heterotimer G fehérjék által közvetített jelátvitel

Az α , β és γ alegységekből felépülő heterotrimer G fehérjék sejten belüli jelátvivőként működnek, a sejtmembrán felől a sejtmag irányába továbbítva a membránreceptorai által generált jeleket (Montell, 2000). A klasszikus G fehérje ciklus az 14. ábrán látható. A $G\alpha$ -GDP komplex kapcsolódik a $G\beta\gamma$ – fehérjékhez és a tipikus 7-transzmembrán receptorához (GPCR - *G Protein-Coupled Receptors*). Amennyiben a ligand kötődése aktiválja a receptort, a guanin-nukleotid kicserélő faktorként (GEF - *Guanine-nucleotide Exchange Factor*) hatva helyettesíti az α alegység GDP-jét GTP-re (Afshar és mtsi., 2004). Ennek következtében $G\alpha$ -GTP disszociál $G\beta\gamma$ -ról és mindkét részegység kölcsönhatásba tud lépni különböző, a jelátvitel irányát meghatározó effektor molekulákkal. Később a GTP hidrolízisének köszönhetően helyreáll a kiindulási $G\alpha$ -GDP konformáció, ami újra képes kapcsolódni $G\beta\gamma$ -vel, leállítva ezzel a jelátvitelt. A G fehérje jelátvitel receptor-független módon is



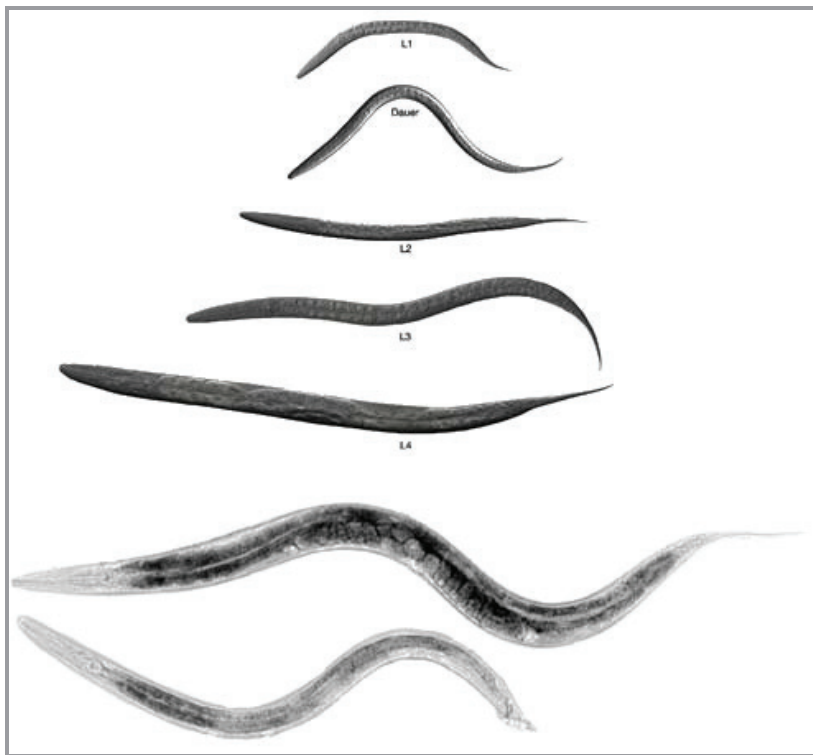
14. ábra. A G-fehérjék működése. A képen a receptor-mediált G jelátvitel két példája látható. A G-fehérje szerepe mindkét esetben a sejt membránján generálódó jel továbbítása a megfelelő enzimaktivitás felé.

aktiválódhat, amikor az alegységek disszociációja a GPR (G Protein Regulator – G fehérje szabályozó) fehérjék hatására következik be. A GPR fehérjék ugyanis kompetálnak a G $\beta\gamma$ -alegységgel a Ga GDP-kapcsolt formájához való kötésért (Manning, 2003). A *C. elegans* genomja huszonegy Ga, két G β és két G γ gént kódol (Jansen és mtsi., 1999; Cuppen és mtsi., 2003). A szekvenciális hasonlóság alapján meghatározott emlős Ga alegység kategóriák (Gs, Gi/o, Gq és G12 – Neves és mtsi., 2002) közül mind a négynek van fonálféreg megfelelője. Ezek a GSA-1 (G protein, Subunit Alpha - Gs), a GOA-1 (G protein, O Alpha subunit - Gi/o), az EGL-30 (EGG-Laying defective - Gq) és a GPA-12 (G Protein, Alpha subunit - G12). A többi Ga-rokon fehérje (GPA-1-11, GPA-13-17 és ODR-3) nem mutat szignifikáns homológiát az osztályozáshoz.

A *goa-1* gén kódolja az emlős Gi/o osztályú Ga alegység egyetlen valódi *C. elegans* megfelelőjét. Emlősökben a Gi/o alegységek számos hormon és neurotranszmitter jelátvitőjeként ismertek (Neves és mtsi., 2002). A GOA-1 fehérje aminosav-szekvencia 80%-nál is magasabb azonosságot mutat az emlős Gao fehérjével (Lochrie és mtsi., 1991). A *goa-1* mutánsok karakterizálása során, illetve az RNS interferencia analízisnek köszönhetően fény derült arra is, hogy a *C. elegans* Gao jelátvitel számos alapvető folyamat, így pl. a sejtosztódás, neuron migráció vagy szinaptikus transzmisszió megfelelő működéséhez is nélkülözhetetlen. Ezenkívül a GOA-1 szerepét kimutatták a peterakás, vulvafejlődés, embrionális életképesség, mozgás, fertilitás és az osztódási orsó orientációjának szabályozása során is (Fraser és mtsi., 2000; Simmer és mtsi., 2003). A neuronok migrációja és a szinaptikus jelátvitel esetében a GOA-1 fehérje GDP-kötött formája pozitívan szabályozódik a ligand-aktiválta receptorok által, illetve negatívan a RGS funkciót ellátó EGL-10 fehérjén keresztül (Mendel és mtsi., 1995; Ségalat és mtsi., 1995; Koelle és Horvitz, 1996). A GOA-1 ilyen jellegű szabályozását „receptor-mediált” útvonalnak is nevezik. Ismert egy „receptor független” szabályozási mód is, amely mitotikus sejtosztódási események során lett leírva (Gotta és Ahringer, 2001). Ennek során a GOA-1 funkciója részlegesen redundáns egy strukturális hasonlóságot mutató Ga alegységgel, a GPA-16 fehérjével (Gotta és Ahringer, 2001; Bergmann és mtsi., 2003). Ebben az útvonalban a Ga jelátvitel membránreceptorok hatásától függetlenül aktiválódik, a GPR-1 és GPR-2 valamint a GEF faktorként ható RIC-8 által (Colombo és mtsi., 2003; Gotta és mtsi., 2003; Srinivasan és mtsi., 2003; Afshar és mtsi., 2004; Couwenbergs és mtsi., 2004). A jelátvitel gátlója ebben az esetben az RGS-7 fehérje (Hess és mtsi., 2004).

3.6. A *Caenorhabditis elegans* általános jellemzése

A *Caenorhabditis elegans*-t Sydney Brenner választotta genetikai modellrendszerül 1963-ban az állati szervezetek differenciálódásának és az idegrendszer működésének tanulmányozásához. A *C. elegans* egy 1,2 mm hosszúságú, fénymikroszkóp alatt áttetsző (transzporens) testű fonálféreg (Brenner, 1974). Rendszertanilag a Hengeresférgek (Nematoda) törzsébe, *Chronadoria* osztályba, *Rhabditidae* családba, illetve *Caenorhabditis* nembe tartozik. A Föld mérsékelt övi szárazföldi területein elterjedt, a talajban él és talajlakó



15. ábra: A *C. elegans* posztembrionális fejlődési stádiumai. A kikelést követően vedlésekkel elhatárolt 4 lárvastádiumon keresztül fejlődik ki a felnőtt állat. Az L1 lárvállapotot követően magas hőmérséklet, táplálékhiány vagy nagy egyedsűrűség hatására alternatív L3 lárvastádium (az ún. dauer láva) alakulhat ki. A kifejllett állatok legalul láthatók, a testesebb és önmegtermékenyítésre képes hermafrodita, valamint a hím.

mikrobákkal táplálkozik.

Az állatok testfelépítése viszonylag egyszerű. Az emésztőrendszer pl. egy 20 sejtből álló csövet alkot. A kifejlett állatok testüregét, melyet nagyobb részben a gonád tölti ki, szorosan egymáshoz tapadó sejtekből álló hipodermisz és izomzat veszi körül. Az idegrendszer a hipodermisz és az izmok közé ágyazódik. A felnőtt állatokat speciális ivari dimorfizmus jellemzi; önmegtermékenyítő hímnős egyedekké vagy hímekké képesek fejlődni. A természetes populációkat szinte kizárólag hermafroditák (hímnős állatok) alkotják, hímek csak 0,2%-ban fordulnak elő. A kifejlett hermafrodita egyedek oocitákat és spermiumokat is termelnek, így mintegy 200-250 utódot képesek létrehozni önmegtermékenyítéssel. A lárvális fejlődés 25°C-on négy lárvastádiumon keresztül (L1-L4) történik és körülbelül 3 nap alatt zajlik le (15. ábra).

A szomatikus sejtek fejlődése invariáns az egyedfejlődés során, vagyis minden egyedben konzervált módon megy végbe (Sulston és Hodgkin, 1977). A kifejlett *C. elegans* teste tehát mindig azonos számú szomatikus sejtből áll. A hermafroditákban 959, a hímekben 1031 szomatikus sejt alkotja a felnőtt állatok testét (Sulston és mtsi., 1980). Az egyedi sejtek fejlődési sorsát megjelenítő sorstérképet vizsgálva derült ki, hogy az állat fejlődése során az egyes szervek kialakulása alapvetően hat alapító sejtre vezethető vissza. Ezek közül három csak egy-egy szerv (a bél, az izomzat és a csíravonal) létrehozásában vesz részt, a másik három alapító sejt több csíralemez, következésképpen több szerv kialakításáért felelős. Mivel a *C. elegans* korai embrionális blasztsejtjei a magasabbrendűekkel ellentétben nem totipotensek, elpusztításuk esetén más sejtek nem képesek átvenni szerepüket (Sulston és Hodgkin, 1977).

A sejtleszármazás vizsgálata során figyelték meg azt is, hogy bizonyos sejtek az állat egyedfejlődése során szabályozottan elpusztulnak, hozzájárulva ezzel az állat testét kialakító fejlődési programhoz. Ezt a folyamatot nevezik apoptózisnak (Horvitz). A *C. elegans* modellrendszert kifejlesztő és az apoptózis szabályozását ismertető munkákat 2002-ben orvosi Nobel-díjjal jutalmazták (Sydney Brenner, John Sulston és Robert H. Horvitz)

A *C. elegans* genom szekvenálása (az elsőként megszekvenált metazoa genom) 1998-ban fejeződött be. Azóta az egyik legintenzívebben vizsgált állati szervezetté vált a genetikai kutatásokban. Ezt példázza, hogy 2006-ban Andrew Z. Fire és Craig C. Mello szintén *C. elegans*-on végzett munkájukért, az RNS interferencia felfedezéséért kaptak orvosi Nobel díjat (Fire és mtsi., 1998), valamint hogy a 2008-ban a kémiai Nobel díjazottak között szerepelt Martin Chalfie, aki a zöld fluoreszcens fehérje használatának egyik úttörő kutatójaként szintén *C. elegans* modellt használt (Chalfie és mtsi., 1994).

4. CÉLKITŰZÉSEK

Az állati egyedfejlődés során a Hh jelátviteli útvonal alapvető szerepet játszik a sejtnövekedés és differenciáció szabályozásában. Az embrionális mintázatképződést - például a mezodermális eredetű szervek fejlődését - és a szöveti homeosztázist szintén a Hh aktivitás kontrollálja. Az abnormális Hh jelátvitel emlősökben tumorfejlődést indukálhat, illetve emberben egyéb betegségek forrása lehet (pl. számos fejlődési rendellenesség). A Hh jelátvitel résztvevői konzerváltan megtalálhatók az ecetmuslicában és az emberi szervezetben is. *Drosophila melanogaster*-ben a Hh jelátvitel transzkripciós faktora a Cubitus interruptus (Ci) fehérje, gerincesekben ezt a feladatot az ún. „glioblasztoma-asszociált onkogének, a GLI fehérjecsalád tagjai látják el. Egyedfejlődési és orvosi biológiai jelentősége ellenére a Hh útvonal által szabályozott effektor célmolekulák azonban kevésbé ismertek.

Doktori munkám célja a Hh jelátviteli útvonal biológiájának mélyebb megértése volt. Munkámhoz a *Caenorhabditis elegans* genetikai modellrendszerrel választottam. A fonálféreg genomjában egyedül a *tra-1* gén kódol GLI/Ci-típusú transzkripciós faktort. A TRA-1A fehérjének a szomatikus szex-determinációs genetikai kaskád terminális tagjaként legfőbb szerepe a női nemi fejlődés biztosítása. Szerepét transzkripciós represszorként azonosították, de eddig kevés közvetlen transzkripcionális célgénje ismert. Ezek a nemi jellegek kialakításában szerepet játszó faktorokat kódolnak. Funkciójuk igen változatos: az ivarspecifikus sejtthál szabályozásában, a hímek farki pározószervének kialakításában, illetve a spermatogenezis folyamatához bizonyultak nélkülözhetetlenek.

Fontos fejlődésbiológiai kérdés, hogy melyek lehetnek azok a további célgének, amelyek a TRA-1 hatását közvetítik. Munkám célja a TRA-1 által közvetlenül szabályozott gének genom szintű meghatározása, ezáltal a Hh jelátviteli útvonal új effektor molekuláinak azonosítása volt. Részletesen kívántam elvégezni azon TRA-1 célgének genetikai analízisét, amelyek más jelátviteli útvonalak ismert komponensei. A potenciális kötőhelyek specifikus TRA-1 kötését *in vitro* gélmobilitási kísérlettel kívántam elvégezni. A DNS-fehérje interakcióra utaló eredményeket megfelelő riporter konstrukciók előállításával és *in vivo* expressziós analízisével terveztem megerősíteni. A *tra-1* és feltételezett célgénjei közötti genetikai kölcsönhatás kimutatása és a szabályozás részleteinek felderítése érdekében pedig kettősmutáns (episztázis) elemzéseket terveztem végezni.

A konkrét célkitűzések:

1. a TRA-1A transzkripciós faktor konszenzus kötőhelyének meghatározása az eddig leírt célgének promóterének elemzésével

2. a konzervált TRA-1A kötőhely genom-szintű analízise: szabályozó régiókban és introni szekvenciákban lévő TRA-1A kötőhelyek meghatározása
3. néhány (számunkra) érdekesnek tűnő potenciális célgén részletes *in vitro* és *in vivo* elemzése
 - 3.1. célgének szabályozó elemében lévő TRA-1A kötőhelyek evolúciós (konzervációs) vizsgálata rokon fajokból származó ortológ szekvenciák segítségével
 - 3.2. célgének szabályozó elemében lévő TRA-1A kötőhelyek fehérje kötési képességének vizsgálata DNS-fehérje kötési *assay*-ekben
 - 3.2.1. a TRA-1A fehérje *in vitro* transzkripciója
 - 3.2.2. TRA-1A kötőhelyet tartalmazó genomi szekvenciák (oligonukleotidok) megsztintizálása, ill. a mutáns oligók megtervezése és szintézise
 - 3.2.3. EMSA (*electromobility gel shift assay*) vizsgálatok radioaktívan jelölt próbák felhasználásával
 - 3.3. célgének expressziós riporter (GFP) rendszerének előállítása, transzgénikus törzsek előállítása és expressziós jellemzése vad vs. *tra-1* (funkcióvesztéses és funkciónyeréses) mutáns genetikai háttérben
 - 3.3. célgének mutáns expressziós riporter (GFP) rendszerének előállítása (a szabályozó régióban a TRA-1A kötőhely mutációs elrontása), transzgénikus törzsek előállítása és expressziós jellemzése
 - 3.4. a célgének genetikai analízise: egyszeres és kettős mutáns törzsek jellemzése. Utóbbiakban a *tra-1* funkcióvesztéses és funkciónyeréses mutációk hatásának vizsgálata az adott célgén mutáns fenotípusára.
4. az eredmények tükrében a *tra-1* egyedfejlődési funkcióira vonatkozó modellek megalkotása
5. az eredmények tükrében a *C. elegans* szex-determinációs génkaskád funkciójának kiterjesztése
6. az eredmények tükrében orvosbiológiai (evolúciós) implikációk megfogalmazása és a Hh jelátvitelre vonatkozó ismeretek bővítése

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. *In silico* kötőhely analízis

A kötőhelykereséshez a következő programokat használtam:

Wormbase (*C. elegans* genom annotációk, szekvenciák, gén információk, BLAST, genomi kereső), *Genome Enhancer - Open Genomics* (szekvenciakeresés), *MEME* (motívum-alapú szekvencia analízis), *ClustalW2* (szekvenciák illesztése), *CLC DNA Workbench* próbaverzió (szekvencia analízis).

5.2. Felhasznált törzsek

5.2.1. *Escherichia coli* törzsek

OP50: Uracil auxotróf *E. coli* B.: A laboratóriumi *C. elegans* vonalak táplálékául szolgáló törzs.

HT115(DE3): Az etetéses RNS interferenciához használt *E. coli* törzs. F⁻, mcrA, mcrB, IN(rrnD- rrnE)1, rnc14::Tn10(DE3 lizogén: lavUV5 promóter -T7 polimeráz) (IPTG-indukálható T7 polimeráz) (RNAs III)

5.2.2. *C. elegans* törzsek

A kísérletek során vad típusú *Caenorhabditis elegans* törzs a „Bristol (N2)” változatot jelenti (Brenner, 1974). A felhasznált törzsek illetve az allélok megnevezését az alábbi lista tartalmazza:

AH35: *unc-119(e2498)III; zhIs1[unc-119(+) + lin-. 39::gfp]*

CB2823 *tra-1(e1488)III; eDp6(III:f)*

CB2590 *tra-1(e1099)/dpy-18(e1096)III*

CB2810 *tra-1(e1575)/+ III; unc-42(e270) him-5(e1490) dpy-21(e428)V*

CB3844 *fem-3(e2006)IV*

NG41 *sex-1(gm41)X*
 TY2384 *sex-1(y263)X*
 CB428 *dpy-21(e428)V*
 TY2431 *him-8(e1487)V; xol-1::gfp(yIs34)V*
 CB1489 *him-8(e1489)IV*
 CB4088 *him-5(e1490)V*
 BU099 *hbEx2[mut pxol-1::gfp + unc-119(+) + rol-6(su1006)]*
 TY1807 *xol-1(y9)X*
 CB3769 *tra-1(e1575gf)/+III; tra-3(e1767)IV*
 DH1033 *sqt(sc103)II; blsI[VIT-2::GFP + rol-6(su1006)]X*
 CB678 *lon-2(e678)X*
 MT688 *lin-12(n137)/unc-32(e189)III; him-5(e1490)V*
 MT2375 *lin-12(n137)dpy-19(e1259)/lin-12(n676n909)unc-32(e189)III; him-5(e1467)V*
 CB3844 *fem-3(e2006)IV*
 RA91 *ql76 I/hT2 [qls48(tra-1::gfp)](I;III)*
 RA7 *rdEx1[tra-1::gfp + rol-6(su1006)]*
 AH30 *zhIs1[lin-39::gfp + unc-119(+)]IV; unc-119(e2498)III*
 NH646 *ayIs9[egl-17::gfp + dpy-20(+)]V; dpy-20(e1282ts)IV*
 AH142 *zhIs4[lip-1::gfp + unc-119(+)]; unc-119(e2498)III*
 MT111 *lin-8(n111)II*
 MT1808 *lin-38(n751)II*
 MT8878 *dpl-1(n2994)II*
 MT11147 *dpl-1(n3643)II*
 MT10430 *lin-35(n745)I*
 MT1806 *lin-15(n767)X*
 MT6034 *lin-36(n766)III*

5.3. Törzsfenntartás

A *C. elegans* törzseket laboratóriumi körülmények között 15 és 25°C között, Petri lemezekbe öntött NGM agaron növesztett *E. coli* OP50 baktériumpázsiton (továbbiakban NGM lemezen) tartjuk. Az állatokat egyedileg platina tű segítségével, nagyobb mennyiségben pedig az agardarabok kivágásával és áthelyezésével, illetve a lemezről való lemosással

mozgatjuk. A törzsek hosszútávú tárolása -80°C-on, illetve folyékony nitrogénben fagyasztással történik. A mutáns, illetve transzgénikus törzsekkel a kísérletek 25°C-on végeztem el (néhány kivételtől eltekintve, ezek a szövegben jelölve vannak).

1 liter NGM agar előkészítése az alábbiak szerint történik:

3 g NaCl

17 g agar

2,5 g pepton

1 ml koleszterol (5 mg/ml EtOH-ban)

975 ml H₂O

autokláv, majd 60°C alá hűtve sterilen hozzáadni a következő komponenseket:

1 ml 1M CaCl₂

1 ml 1M MgSO₄

25 ml 1M KH₂PO₃ (pH=6.0)

Ez az NGM agar alapváltozata, melynek módosításával specifikus lemezek készíthetők. RNS interferencia alkalmazásakor a fentieken kívül a szelektivitást biztosító ampicilin és tetraciklin antibiotikumokat, illetve az indukcióhoz szükséges IPTG-t adtam a lemezekhez.

5.4. RNS interferencia

Az „etetéses” RNS interferencia (RNSi) módszer – amely során a specifikus dsRNS-t a táplálékként használt baktérium expresszája – a *C. elegans* genetikában széleskörűen használt eszköz gének „csendesítésére” (aktivitásának csökkentésére). A csendesíteni kívánt gén mRNS-éből egy körülbelül 900 bázispár hosszúságú szakaszt reverz transzkriptázzal cDNS-sé írok, majd PCR reakció segítségével megsokszorozzuk. A kapott cDNS-t T-vektorba (PROMEGA), majd specifikus RNSi vektorba (pPD129.36 – A. Fire, Stanford Egyetem) klónozzuk. Az ampicilin rezisztenciagént hordozó RNSi vektort aztán egy speciális tetraciklin-rezisztens HT115 *E. coli* törzsbe (HT115) transzformáljuk, amelyet a fent leírt módon készített NGM^{TetrAmpIPTG} lemezekon növesztjük. A baktérium sejtek ezeken a lemezekon az IPTG hatására átírják a célgénre specifikus kettős-szálú RNS szakaszt. A baktérium elfogyasztását követően a *C. elegans* beléből a dsRNS felszívódik a

bélhámsejtekbe, majd sejtről-sejtre szétterjed a szervezetben, és csendesíti a homológ szakaszokat tartalmazó endogén gén(ek)e)t.

5.4.1. Totál RNS izolálása *C. elegans*-ból

Az állatokat 15 ml-es Falcon csövekbe mossuk desztillált vízzel. Az ezután következő lépések:

- centrifugálás 2000 rpm-en 1 percig
- felülúszó eltávolítása
- 2 ml TRIZOL adása a csapadékhoz
- intenzív rázatás (vortex)
- minták szétosztása Eppendorf csövekbe (1250 µl csövenként)
- 5 perc inkubálás szobahőmérsékleten (RT)
- 10 perc fugalás 14000 rpm-en
- felülúszó átvitele új Eppendorf csövekbe
- 200 µl CHCl_3 (kloroform) hozzáadása
- vortex 15 másodpercen át
- 5 perc inkubálás szobahőmérsékleten
- 15 perc fugalás 14000 rpm-en
- felső vizes fázis átvitele új Eppendorf csövekbe
- 500 µl isopropanol hozzáadása és vortex
- 10 perc inkubálás szobahőmérsékleten
- 10 perc fugalás 14000 rpm-en
- vizes fázis óvatos eltávolítása a csapadékról
- csapadék mosása 75%-os ETOH-al (75%-os alkohol oldat DEPC (dietil-pirocarbonát) kezelt RNáz-mentes vízzel készítendő)
- 5 perc fugalás 8000 rpm-en
- felülúszót eltávolítása
- csapadék levegőn történő szárítása 5 percig
- csapadék feloldása 20 µl DEPC kezelt vízben
- RNS tárolása -70°C-on

5.4.2. RT-PCR

Az RNS interferencia kísérletekhez tervezett primerek NcoI hasítóhelyet tartalmaztak.

A klónozási folyamat lépéseinek felsorolása (Titan One-Tube RT-PCR Kit, Roche):

-PCR mixtúra komponensei:

- 1 µl totál RNS (1 µg/reakció)
- 1 µl dNTP mix (10 mM mindegyikből)
- 1 µl *forward* primer (20 µM)
- 1 µl *reverse* primer (20 µM)
- 2 µl DTT
- 5 µl 5X puffer
- 1.5 µl Mg^{2+}
- 1 µl polimeráz keverék
- 11 µl DEPC víz
- ÖSSZESEN: 25 µl

RT-PCR Program:

1. ciklus: 50°C 30 perc
2. ciklus: 94°C 2 perc
3. ciklus: 57°C 1 perc
4. ciklus: 72°C 1 perc
5. ciklus: 93°C 35 másodperc
- 3-tól az 5-ös ciklusok ismétlése 35-ször

A PCR fragmentek izolációja gélből (QIAEX II Gel Extraction Kit, Quiagen):

- RT-PCR minták 0.8% agaróz gélre vitele
- futtatás 0.8%-os agaróz gélben
- steril zsilettpengével a megfelelő DNS csík kivágása UV lámpa felett (kb. 1kb-nyi tartományban)
- 15 µl QIAEX II oldat hozzáadása a kivágott gélhez (használat előtt 30 másodperc vortexelés)
- 1 ml QX1 puffer hozzáadása
- inkubálás 50°C-on 10 percig, majd 2 perc rázatás
- 1 perc fugálás 13000 rpm-mel
- felülúszó eltávolítása

- 500 µl QX1 hozzáadása és a csapadék feloldása
- 1 perc fúgálás
- felülúszó eltávolítása
- 500 µl PE puffer hozzáadása és a csapadék feloldása
- 1 perc fúgálás
- felülúszó eltávolítása
- 500 µl PE puffer hozzáadása és a csapadék feloldása
- 1 perc fúgálás
- felülúszó eltávolítása és levegőn szárítása
- DNS feloldása 20 µl MQ vízben (MQ víz: milliQ, nagyon alacsony elektromos vezető képességű, tisztított és sterilizált desztillált víz)

5.4.3. Klónozási lépések

Az RT-PCR fragmentek és a “feeding vektor” (pPD129.36) NcoI-es emésztése. Emésztési lépések:

- 3 µl NcoI 10X puffer hozzáadása az RT-PCR során kapott termékhez
- 3 µl 10 X BSA hozzáadása (10mg/ml)
- 2 µl NcoI enzim hozzáadása (10U/µl)
- inkubáció 1 órán át 37°C-on
- 5 µl *feeding* vektor emésztése:
 - 2 µl 10X puffer hozzáadása
 - 2 µl 10X BSA hozzáadása (10mg/ml)
 - 10 µl MQ víz hozzáadása
 - 1 µl NcoI hozzáadása (10U/µl)
 - inkubálás 1 órán át 37°C-on

Az emésztett minták tisztítása (QIAEX II Gel Extraction Kit, Quiagen):

- PB puffer hozzáadása a megemésztett mintához
- minta oszlopra töltése
- 1 perc centrifugálás 13000 rpm-mel, átfolyó eltávolítása
- 1 µl PE puffer hozzáadása
- 1 perc centrifugálás 13000 rpm-mel, átfolyó eltávolítása

- 1 perc centrifugálás 13000 rpm-mel
- 20 µl MQ víz hozzáadása
- 1 perc centrifugálás 13000rpm-mel
- DNS tárolás -20°C-on

Ligálási lépések (T4 DNA Ligase, Invitrogen):

- 4 µl inszert (NcoI-emésztett RT fragment)
- 1 µl vektor (NcoI- emésztett feeding vektor)
- 5 µl 2X puffer
- 1 µl T4 ligáz
- 1 óra inkubálás 20°C-on

Feeding baktériumok (HT115-ös *E. coli* törzs) transzformálása:

- 50 µl Z-kompetens sejt (Zymoresearch Gmbh) -70°C-ról
- 30 perc jégén történő inubálás
- 2-3 µl ligátum hozzáadása a sejtekhez
- 5 perc inkubálás jégén
- hő sokk 37°C-on 1 percig
- 2 perc inkubálás jégén
- 300 µl LB oldat hozzáadása (mi az az LB –rövidítések jegyzéke)
- inkubálás 37°C-on 1 órán át (rázatás)
- 200 µl sejtszuszpenzió LB^{AmpTetr} lemezekre történő szélesztése
- egy éjszakás inkubáció 37°C-on

Plazmid izoláció (Wizard Plus SV Minipreps, Promega):

- egyedi telepek felvétele 5 ml LBA^{mpTetr}-be

(Az LB^{AmpTetr} készítése:

- 950 ml dH₂O
- 10 g tripton
- 5 g élesztő kivonat
- 10 g NaCl
- 200 µl 5M NaOH
- autokláv, majd 60°C-ra hűtés
- 1 ml 100mg/ml Amp-t és 1 ml Tetr-t hozzáadása

- 12 órán inkubáció 37°C-on
- 1 ml szuszpenzió eppendorfba mérése
- 2 perc fugalás 9000 rpm-en
- felülúszó eltávolítása
- sejtek feloldása 250 µl "Cell resuspension solution"-ban vortexeléssel
- 250 µl "Cell Lysis Solution" hozzáadása, óvatos összerázás
- 10 µl "Alkaline Protease Solution" hozzáadása, finom összerázás
- 5 perc inkubálás szobahőmérsékleten
- 200 µl "Neutralisation solution" hozzáadása, finom összerázás
- 10 perc fugalás 12000 rpm-en
- felülúszó oszlopra töltése
- 750 µl "Column Wash Solution" hozzáadása
- 1 fugalás 12000 rpm-en
- átfolyó eltávolítása
- 200 µl "Column Wash Solution" hozzáadása
- 1 fugalás 12000 rpm-en
- átfolyó eltávolítása
- 50 µl MQ víz hozzáadása
- 1 fugalás 12000 rpm-en

A DNS ellenőrzése NcoI-es emésztést követően gélelektroforézissel történik. A megfelelő vektort tartalmazó baktériumokat RNSi lemezekben növesztettem, a kísérletek során erre kerültek az L3 stádiumú lárvák. Az RNSi fenokópiát a felnőtt állatokon illetve az F1 és F2 generációkon vizsgáltam. Az állatok RNSi kezelése 25°C-on történt. Az RNSi kísérletek során felhasznált primerek szekvenciája:

tra-1L: 5'-CTA GCT AGC TAG ACA ATC CGG AGC ATC TCAAG-3'

tra-1R: 5'-GGG GTA CCC CTG ATG ATG TTG AGC CAG AGC-3'

tra-1aL: 5'-ACG TGC TCA ACA ACT CAT GG-3'

tra-1aR: 5'-TCT AAT GGA CGA CGG GTT ATG-3'

tra-1abL: 5'-AGG ATC CCG ATA CGG TTG TC-3'

tra-1abR: 5'-TGG CAA CCG TAC TAC CAT TTG-3'

fem-3L: 5'-TCC GGG TTC AGA TGA TGT AG-3'

fem-3R: 5'-TCA AAC GGC GAA ATT TGT AAC-3'

lin-12L: 5'-CGC TTC ATA TTG GCT CAT GTC-3'

lin-12R: 5'-CCA GCT TCG CAT TTA TTA TTC AC-3'

xol-1L: 5'-CAT GCC ATG GCA TGG CGC GAA AAC AGT CCA GTC-3'

xol-1R: 5'-CAT GCC ATG GCA TGG CCG TCG TCG AAA AAT GAG-3'

sea-2L: 5'-CAT GCC ATG GCA TGC GGA AAG CTC CTC AAC TCT G-3'

sea-2R: 5'-CAT GCC ATG GCA TGA CCG TCA CGA ATG AGG TTT C-3'

5.5. *In vitro* fehérje termelés

A TRA-1A fehérjét *in vitro* transzkripció és transzláció során nyertem a teljes hosszúságú *tra-1* cDNS-t (pDZ118, David Zarkower készítette) használva, egy T7-alapú nyúl retikulocita lizátum rendszer alkalmazásával (TNT®).

5.5.1. DNS tisztítás fenol-kloroform extrakció alkalmazásával

A kísérletet az alábbi protokoll szerint végezzük:

- 30 µl miniprep DNS
- 170 µl MQ víz hozzáadása
- 200 µl fenol hozzáadása, vortexelés, centrifugálás 5 percig 13000 rpm sebességgel
- felülúszó átvitele új Eppendorf csőbe
- 200 µl fenol hozzáadása, vortex, centrifugálás 5 percig 13000 rpm sebességgel
- felülúszó átvitele új Eppendorf csőbe
- 200 µl kloroform hozzáadása, vortex, centrifugálás 5 percig 13000 rpm sebességgel
- felülúszó átvitele új Eppendorf csőbe
- 200 µl kloroform hozzáadása, vortex, centrifugálás 5 percig 13000 rpm sebességgel
- felülúszó átvitele új Eppendorf csőbe
- 130 µl nátrium-acetát (3M, pH5.2) és 750 µl etanol hozzáadása, vortex
- inkubálás 30 percig -70°C-on
- centrifugálás 4°C-on 5 percig 13000 rpm sebességgel
- felülúszó leszívása, a csapadék mosása 750 µl -20°C-os 70% etanollal
- centrifugálás 4°C-on 5 percig 13000 rpm sebességgel
- felülúszó leszívása, csapadék szárítása
- csapadék DNS feloldása 10-20 µl steril MQ vízben vagy TE pufferben

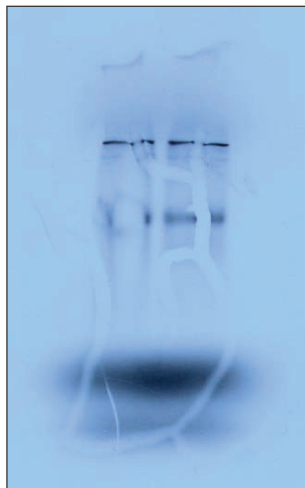
5.5.2. *In vitro* transzkripció és transláció

- RNS polimeráz jégen történő felolvasztása
- TNT® retikulocita lizátum felolvasztása kézben, majd jégen tárolása
- az alábbiak szerint jégen összemérni a reakciót egy 0,5 ml-es Eppendorf csőben:
 - 25 µl TNT® retikulocita lizátum
 - 2 µl TNT® reakció puffer
 - 1 µl TNT® T7 RNS polimeráz
 - 1 µl aminosav mix – metionin, 1mM
 - 1 µl aminosav mix – leucin, 1mM – csak a nem jelölt mintához
 - 2 µl [35S] metionin (>1,000Ci/mol, 10mCi/ml) – csak a jelölt mintához
 - 1 µl Rnasin ribonukleáz inhibitor (40U/µl)
 - 2 µl fenol-kloroform tisztított DNS templát
 - nukleáz-mentes vízzel kiegészíteni 50 µl végtérfogatra
 - inkubálni 30°C-on 90 percig
 - jelölt próba forralása 5 percig, majd SDS gélen történő futtatás
 - szárítás 2 órán át
 - 80°C-on egy éjszakán keresztül Kodak XAR film előhívása
 - termék tárolása -80°C-on

Minta egy sikeres fehérje termelésről:

TRA-1A (170kDa) -

TRA-1B (37kDa) -



5.6. EMSA

(Electro-Mobility Shift Assay / Gel Mobility Shift Assay / Bandshift kísérlet)

5.6.1. Anellálás

A kísérletek során a következő oligonukleotidokat használtam:

egl-1 L 5'-GGG GGA GAA TTT TAT GGA CCA CCC GGT TAG GAG TA-3'

egl-1 R 5'-GGG GGT ACT CCT AAC CGG GTG GTC CAT AAA ATT CT-3'

lin-39 L 5'-GGG GGT CTT AAA CCA TGA CCA CCC ACT TGA GCA CA-3'

lin-39 R 5'-GGG GGT GTG CTC AAG TGG GTG GTC ATG GTT TAA GA-3'

lin-39 mut L 5'-GGG GGT CTT AAA CCA TCG GTA CCC ACT TTC GCA CA-3'

lin-39mut R 5'-GGG GGT GTG CGA AAG TGG GTA CCG ATG GTT TAA GA-3'

mab-3 L 5'-GGG GGC GTT CTC TAA TTA TCG TCG TGT GAG GTC TTC TAT-3'

mab-3 R 5'-GGG GGA TAG AAG ACC TCA CAC GAC GAT AAT TAG AGA ACG-3'

xol-1 L 5'-GGG GCC CCT GTA AGA CCA CAC ACG ACG AAA ACC TCT TGT T-3'

xol-1 R 5'-GGG GAA CAA GAG GTT TTC GTC GTG TGT GGT CTT ACA GGG G-3'

mut xol-1 L 5'-GGG GGC CCC TGT AAC GGT ACA CAC GAC GAA AAC CTC TTG TT-3'

mut xol-1 R 5'-GGG GGA ACA AGA GGT TTT CGT CGT GTG TAC CGT TAC AGG GG-3'

-oligonukleotidok higítása 1 µg/µl koncentrációra

-összekeverni 40-40 µl-t a megfelelő oligonukleotidkból (L+R)

-9 µl 10x TE puffer hozzáadása

-1 µl steril mQ víz hozzáadása

-inkubálás 68-70°C-on 10 percig

-lassú hűtés szobahőmérsékletre (kb. 1,5 óra)

-tárolás -20°C-on felhasználásig

5.6.2. α32P-dCTP jelölés

-1-1,5 ul anellált oligonukleotid

- 3 µl Klenow puffer vagy „Nick” translációs puffer hozzáadása
- 3 µl 2mM dATP hozzáadása
- 3 µl 2mM dTTP hozzáadása
- 3 µl 2mM dGTP hozzáadása
- 4 µl 2mM α 32P-dCTP (3000Ci/mmol) hozzáadása
- kiegészíteni mQ vízzel 30 µl-re
- 1 µl Klenow enzim hozzáadása
- inkubálás 30 percig szobahőn
- Klenow inaktiválása 70°C-on 10 percig
- gélszűrés Sephadex G25 oszlopokon
 - összerázni az oszlop tartalmát
 - letörni az oszlop alját, kinyitni a kupakot, az oszlopot Eppendorf csőbe helyezni
 - centrifugálni 1000 rcf-fel 1 percig
 - áthelyezni az oszlopot egy másik Eppendorf csőbe
 - 1 µl radioaktív próbát félretenni 1ml szcintillációs kottélba
 - felvinni a maradék próbát az oszlopra
 - centrifugálni 1000 rcf-fel 4 percig, megtartani az átfolyót
 - 1 µl átfolyó próbát átvinni 1 ml szcintillációs kottélba
- a szűrés előtti és a szűrt minták radioaktivitásának összehasonlítása
- szűrt minták 40000 cpm/µl-re történő hígítása

5.6.3. Natív poliakrilamid gélfuttatás, autoradiográfia

4%-os poliakrilamid natív gél:

- 12 ml of 30% akrilamid:bisakrilamid (29:1)
- 9 ml of 5x TBE puffer
- H₂O 90 ml végtérfogatra
- 900 µl of 10% APS
- 70 µl TEMED
- polimerizálódás 30 percig
- előfuttatás 30 percig 0,5%-os TBE-ben 160-180V-on
- reakcióelegy:
 - 20 µl BufferE
 - 200 ng Poly(dIdC)

-3 µl fehérje vagy lizátum kontroll

BufferE:

-20 mM HEPES (pH=7.9)

-20% (v/v) glicerol

-0,1 M KCl

-0,2 mM EDTA

-0,5 mM DTT – mindig frissen hozzáadni

-(0,5 mM PMSF – frissen hozzáadni) - az eddigieket szokás Dignam's D Buffer-ként hívni

-1 mg/ml acetilált BSA

-proteáz inhibitor (*Complete Mini*, 1 tabletta 10 ml-hez)

-0,1% NP40

-50 µM ZnSO₄

-5 percig jégen inkubálni az elegyet a radioaktív minta nélkül

-hozzáadni a jelölt DNS-t és folytatni a jégen történő inkubálást 25 percig

-felvinni a mintákat a géltre és megfuttatni a próbafuttatás során beállított paraméterekkel

-80°C-on megszárítani a gél

-filmet helyezni a géltre és előhívni egy éjszakán keresztül -70°C-on

Az autoradiográfiához Kodak XAR röntgenfilmet használtam. Az α³²P-dCTP-t és az γ-³⁵S-dATP-t az Izotóp Intézet Kft szállította.

5.7. Vulvaszám meghatározás

A kifejllett állatok multivulva fenotípusának jellemzése Olympus BX mikroszkóp segítségével történt meg. Ennek során a különböző genetikai háttérű állatok vulvaszerű kitüremkedéseit számoltam meg és hasonlítottam össze.

5.8. Az embrionális életképesség meghatározása

5-50 hermafrodita állatot tettünk egy tiszta NGM lemezre, majd 2 óra múlva eltávolítottuk a hermafroditákat. A hermafroditák által lerakott (hasonló stádiumú) embriók megszámlálása, majd 2 nap múlva a kifejllett állatok számának meghatározása. A két érték különbségét tekintjük embrionális életképtelenségnek. Ez a módszer nem veszi figyelembe,

ha az állatok a lárvális fejlődés során pusztultak el, de a kísérletek során ezt folyamatosan ellenőriztem.

5.9. Transzgének létrehozása

A a lehetséges TRA-1A kötőhelyet tartalmazó *xol-1::gfp* riporter ($p_{mutxol-1::gfp}$) létrehozásához két genomi fragmentet hoztunk létre az alábbi primerekkel:

Forw1 5'-AAG GCG CGC CTT GCA GAA CAG CTT TGA TCG-3'

Rev1 5'-TGT TGA CCG TTA CAG GGG TAT TCG CGG GCG TTT GAA AAT AGT G 3'

Forw2 5'-CGA ATA CCC CTG TAA CGG TCA ACA CGA CGA AAA CCT CTT GTT CC-3'

Rev2 5'-TTG CGG CCG CAA GGA CCC TGC AAC AAA ACG-3'.

Ezekből a PCR termékekből fúziós PCR-rel egy hoztam létre a végső fragmentet, melyet *AscI* és *NotI* emésztést követően a pRH21 vektorba klónoztam. A klónozás és a PCR az előzőekben bemutatottak szerint történt. Az injektálással történt transzformálás után az extrakromoszómális transzgént hordozó állatok analízisét vad típusú és *him-5(e1490)* mutáns háttérben végeztem.

5.10. Transzgénikus állatok előállítása

2% kiszáritott agarpadra 4-5 csepp szerves (mineral) olajat cseppentünk. Ezután 4-5 fiatal felnőtt hermafrodita állatot helyezünk az agarpadokra (1-1-et az olajcseppek alá, amely megakadályozza a dehidrációjukat). Az így immobilizált állatokat Axiovert 135 Zeiss invert mikroszkóp csúsztható asztalára helyezjük, majd Narashige mikromanipulátor segítségével az állatok disztális gonádkarjába injektáljuk a DNS oldatot mikroinjektáló tű (vékony hegyű üvegű) segítségével. A DNS oldat üvegűbe történő töltését mikropapillárisal, az állatokba történő bejuttatását N₂ gáz segítségével végezzük el. Injektálás után az állatokat egyedileg M9 fiziológiai oldatba helyezjük (*recovery*), majd NGM lemezekre helyezjük. Az F1 generációban transzgénikus utódokat szelektálunk, majd transzgénikus vonalakat (az örökítő vonalak kiválogatása) izolálunk. Az alkalmazott DNS oldat általában 20-50 ng/μl koncentrációjú. A transzgénikus állatok expressziós jellemzése fluoreszcens feltétellel felszerelt Olympus BX mikroszkóp segítségével történt meg.

6. EREDMÉNYEK

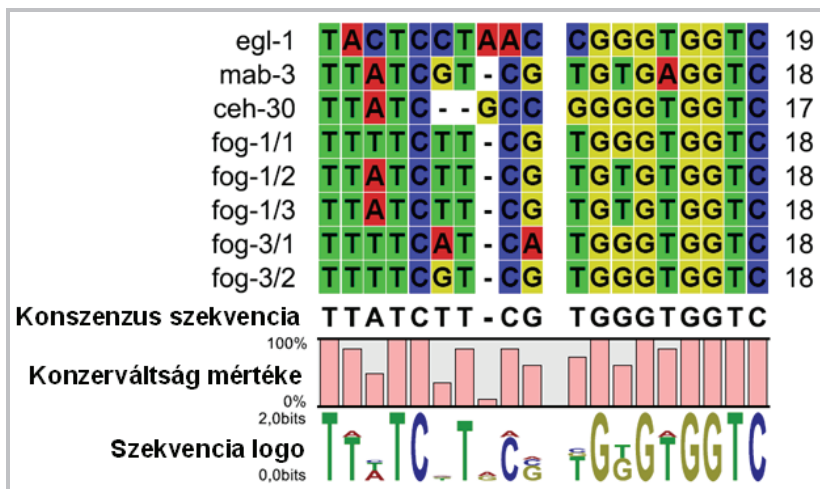
6.1. A TRA-1A fehérje transzkripció célpontjainak genom szintű *in silico* meghatározása

A Hh jelátvitel terminális transzkripció faktorát *Drosophila melanogaster* esetében a *Ci* gén, míg emberben a *Gli* gének kódolják. Ezen gének *C. elegans* ortológja a *tra-1*. A *tra-1* génről két fehérje termék készülhet alternatív *splicing* során. A TRA-1A transzkripció faktor öt cink-ujj doménnel rendelkezik és kettős szálú DNS-, illetve RNS-kötésre képes, míg a TRA-1B fehérje csupán két cink-ujj domént tartalmaz, és nem tud nukleinsavakat kötni (Zarkower és Hodgkin, 1993).

A *tra-1* gén a szomatikus szex-determinációs génkaskád terminális faktora, amelynek aktivitása a *C. elegans* egyedfejlődése során kialakuló összes ivar-specifikus különbségért felelős. Egyedfejlődési jelentősége ellenére napjainkig kevés olyan gént sikerült azonosítani, amelyek aktivitását a TRA-1A közvetlenül szabályozza. Az eddig megismert *tra-1* célgénnek mindegyike a TRA-1A fehérje transzkripció represszor tulajdonságát tükrözi (Conradt és Horvitz, 1999; Yi és mtsi., 2000; Chen és Ellis, 2000; Schwartz és Horvitz, 2007; Peden és mtsi., 2007; Portman és mtsi., 2008). Ezek az ismert TRA-1A célgének a fonálféreg testének különböző ivar-függő tulajdonságainak kialakításáért felelősek.

A TRA-1A fehérje új lehetséges célgénjeinek azonosításához *in silico* megközelítést alkalmaztam. Az eddig megismert közvetlen célgének esetében leírt TRA-1A kötőhelyek különbözőségeit, illetve hasonlóságait figyelembe véve meghatároztam a feltételezett konszenzus kötőszekvenciát (16. ábra), amelyben az egyes nukleotidok pozíciója függ a különböző esetekben leírt szekvenciákban mutatott konzerváltságuktól. A kötőhelyen belül ugyanis egyes részek jobban, más elemek kevésbé vagy egyáltalán nem konzerváltak. A kötőhely kereséshez használt program (*Genome Enhancer - Open Genomics*) képes ezeket az eltéréseket figyelembe venni, így használhatóan bizonyult arra, hogy a konszenzus szekvenciát összevessem a teljes *C. elegans* genom szekvenciájával.

A program predikciói során nyert feltételezett kötőhelyek közül a továbbiakban kizárólag azokkal foglalkoztam, amelyek gének szabályozó régióiban – feltételezett promóterben, introni szekvenciákban továbbá a TRA-1A RNS-kötő képessége miatt a 3' és 5' nem transzlálódó régiókban – helyezkedtek el. 42 olyan *C. elegans* gént találtam, amelyek



16. ábra. TRA-1A konszenzus kötőhely meghatározása. Az ábra felső részén az eddig ismert TRA-1A/GLI kötőszekvenciák és belőlük generált általános feltételezett TRA-1A kötőhely látható.

megfeleltek ezeknek a feltételeknek.

A következő lépésben a kötőszekvencia konzerváltsága alapján szűkítettem a lehetséges célgénék listáját. Ez úgy történt, hogy a *C. elegans* genomon azonosított lehetséges TRA-1A célgénék kötőhelyet tartalmazó szabályozó régióit összehasonlítottam egy evolúciósan közeli rokon faj, a *Caenorhabditis briggsae* megfelelő ortológ génjeinek genomi környezetével. Amennyiben mindkét fajban hasonló pozícióban jelen van a kötőhely, az a szabályozó mechanizmus evolúciós konzervációjára, vagyis a szekvencia funkcionális voltára utalhat. A *C. briggsae* célgénék lehetséges kötőhelyeit figyelembe véve a potenciális célgénék listája 21 génre szűkült, ezek esetében viszont megalapozott a szabályozási kapcsolat feltételezése. Ezeket a géneket a 2. táblázatban sorolom fel. Egyes gének (például a *xol-1* vagy az *abl-1*) esetében a kötőhely egy távolabbi rokonfaj, a *Caenorhabditis remanei* ortológok genomi környezetében is azonosítható volt. Meg kell jegyezni, hogy ennek a fajnak a szekvenciája a kötőhelykeresés idején még nem volt teljes, így több gén esetében nem nyílt lehetőség a konzervációs vizsgálatra.

ORF	Génnev	Feltételezett biológiai funkció	A kötőhely elhelyezkedése	A <i>C. briggsae</i> kötőhely elhelyezkedése
C06E8.3	<i>prk-1 (Pim oncogene Related Kinase)</i>	Szerin-treonin protein kináz	promóter (6kb)	promóter (5,6kb)
C07H6.7	<i>lin-39 (abnormal cell LINeage)</i>	Homeodómén fehérje	promóter (0,9kb)	promóter (1kb)
C08C3.3	<i>mab-5 (Male ABnormal)</i>	Homeodómén fehérje	3'UTR	3'UTR
C18A11.5	<i>xol-1 (XO Lethal)</i>	GHMP kináz, a szex-determináció és dóziskompenzáció fő szabályzója	promóter (0,15kb)	promóter (<0,1kb)
C41D7.2	<i>ptr-3 (PaTched Related family)</i>	Patched receptor	promóter (5,5kb)	promóter (1,4kb)
C53C11.3	<i>ptr-5 (PaTched Related family)</i>	Patched receptor	promóter (3,8kb)	promóter (1,7kb, 3kb - 2x))
F08B1.1	<i>vhp-1(VH1 dual-specificity phosphatase family)</i>	MAP kináz foszfatáz	intronok (4x)	intronok (2x)
F08F3.9		snRNS aktiváló komplex alegység	promóter (0,1kb - 3x)	promóter (0,3kb - 2x)
F09E8.7	<i>lev-1 (LEVamisole resistant)</i>	Acetilkin receptor	1. intron (2x)	1. intron (2x)
F13D11.2	<i>hbl-1 (HunchBack Like)</i>	Transzkripció faktor	promóter (1,3kb - 2x)	promóter (1,3kb)
F17A2.1	<i>xtr-2 (MX region of TRA-2 Related)</i>	TRA-2-szerű csírvonal szex-determinációs faktor	promóter (1kb - 3x)	promóter (2,5kb - 2x, 1,3kb)
F28F5.3	<i>lim-8 (LIM domain family)</i>	Miozin kölcsönható fehérje	promóter (0,3kb)	promóter (2,2kb)
F38E11.2	<i>hsp-12.6 (Heat Shock Protein)</i>	Hő sokk faktor	promóter (0,4kb)	promóter (0,3kb)
F48E8.1	<i>lon-1 (LONg)</i>	TGF- β ta jelátvivő	promóter (2,5kb)	promóter (2,3kb)
K07D4.7	<i>tag-218(Temporarily Assigned Gene name)</i>	Guanin nukleotidcserélő fehérje	promóter (1,6kb)	promóter (1,3kb)
K10C2.5	<i>grl-6 (GRound-Like)</i>	Hedgehog-szerű fehérje	promóter (<0,1kb)	promóter (0,1kb)
K11G9.2		Karboxil-észteráz	promóter (<0,1kb)	promóter (0,2kb)
M79.1	<i>abl-1 (related to oncogene ABL)</i>	SH 2-3 domén nem-receptor tirozin kináz, csírvonal apoptózis szabályzó	1. intron	1. intron
R06B9.6	<i>mig-14 (abnormal cell MIGration)</i>	Wntless-szerű transzmembrán fehérje	promóter (3kb*)	promóter (0,2kb)
R10E9.1	<i>msi-1 (MuSashi family)</i>	mRNS hasító és poliadenilációs komplex-alegység	5'UTR, promóter (2,3kb)	5'UTR, promóter (5,5kb - 2x)
R13H8.1	<i>daf-16 (abnormal DAuer Formation)</i>	FOXO transzkripció faktor	promóter (0,25kb), intronok(2x)	promóter (0,25kb), intronok (2x)
Y47H9C.4	<i>ced-1 (Cell Death abnormality)</i>	transzmembrán fehérje, apoptotikus faktor	promóter (0,3kb)	promóter (0,25kb), 3. intron, 6. intron
C26C6.2	<i>goa-1 (G protein, O, Alpha subunit)</i>	heterotrimer G fehérje alfa alegység	5. exon**	5. exon**

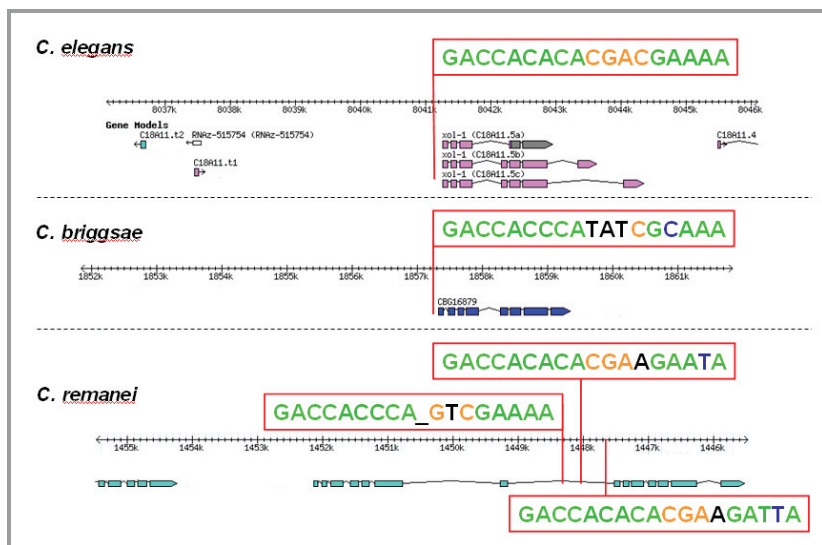
2. táblázat. A konzervált TRA-1A kötőhelyet tartalmazó *C. elegans* gének. (*-a kötőhely távolsága a transzlációs starthelytől, ** - a *goa-1* exoni TRA-1A kötőhely szerepéről a későbbiekben lesz szó)

6.2. A TRA-1A transzkripció faktor szabályozza a *xol-1* gén aktivitását

6.2.1. A TRA-1A fehérje kötődik a *xol-1* gén szabályozó régiójához *in vitro*

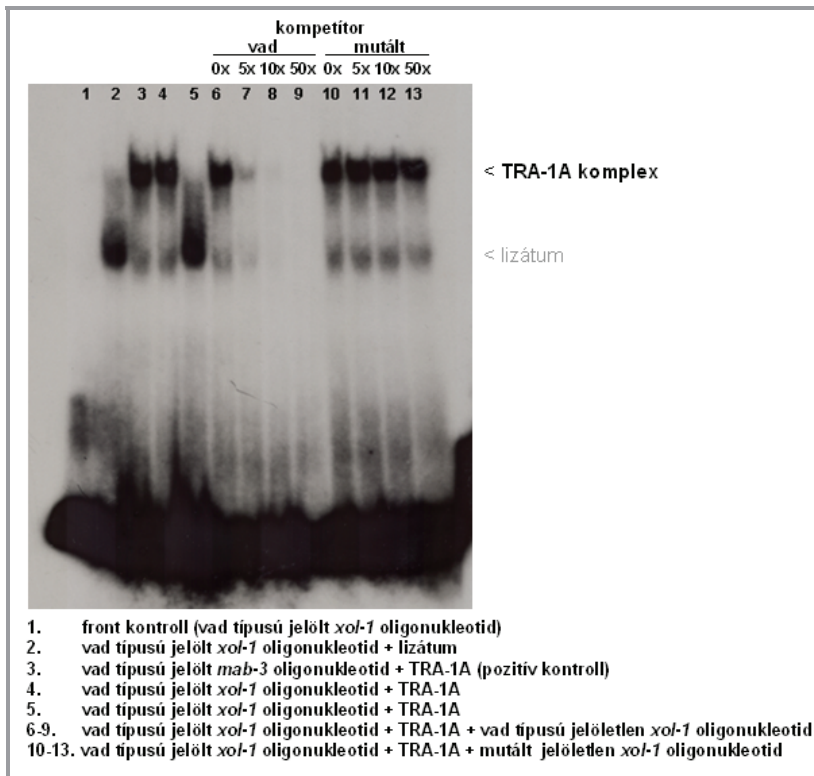
A TRA-1A kötőhely genom szintű *in silico* meghatározása során azonosítottam egy intakt kötőszekvenciát a *xol-1* gén promóter régiójában, 154 bázispárnyira a translációs starthely előtt (17. ábra). Ez a potenciális kötőhely szinte teljes egyezést mutat a *mab-3* gén esetében leírt TRA-1A kötőhellyel (Yi és mtsi., 2000). A közel-rokon *Caenorhabditis* fajok genomi szekvenciáját megvizsgálva megállapítottam, hogy a *C. briggsae* és *C. remanei* fajok esetében is konzerváltan megtalálható a TRA-1A kötőhelyként prediktált szekvencia a *xol-1* gén ortológjainak közvetlen genomi környezetében (17. ábra).

A teljes hosszúságú TRA-1A fehérje képes volt kötődni ehhez a *xol-1* promóter régióhoz *in vitro* (18. ábra). A *tra-1* cDNS-ről (*pDZ118*) nyúl reticulocita lizátumban *in vitro* transzkripció és transláció során termelt fehérjével végzett DNS-fehérjekötési EMSA kísérletekkel igazoltam, hogy a TRA-1A képes kötni az intakt kötőhelyet tartalmazó *xol-1*



17. ábra. A TRA-1A fehérje kötőhelyének pozíciója a *xol-1* gén és homológjainak genomi környezetében. Az ábrán három *Caenorhabditis* faj *xol-1* ortológjainak prediktált génmodellje látható. A pirossal körvonalazott szövegdobozok a feltételezett TRA-1A kötőhelyek szekvenciáját ábrázolják. A szekvenciákban zölddel jelöltem a konzervált régiókban belüli egyezéseket, kézzel a predikciótól eltérő nukleotidokat, narancssárgával és feketével pedig a szabadon változó régió azonos illetve eltérő nukleotidjait.

promóter elemet. Pozitív kontrollként az ismert TRA-1A célgén *mab-3* promóterében található kötőhelyet használtam (Yi és mtsi., 2000). A *xol-1* promóter elem TRA-1A kötőhelyének megváltoztatása négy konzervált nukleotid cseréjével történt. Ebben a kísérletben a *xol-1* promóterben található „GAC CAC ACA CGA CGAA” szekvenciát a négy legerősebben konzervált nukleotid cseréjével a következőre változtattam: „CGG TAC ACA

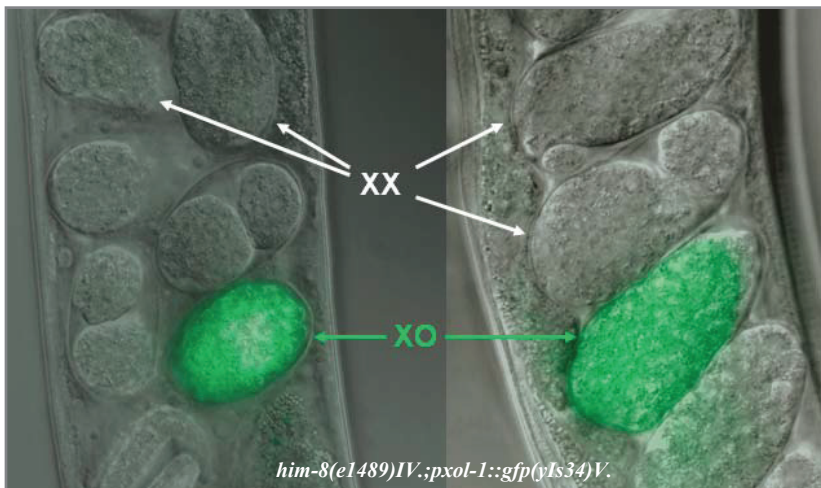


18. ábra. A TRA-1A fehérje szekvencia specifikusan képes kötődni a *xol-1* promóterhez *in vitro*. A pozitív kontrollként használt *mab-3* kötőhelyet, illetve a *xol-1* gén promóterében talált kötőhelyet tartalmazó oligonukleotidok esetében képződött DNS-fehérje komplex. A *xol-1* oligonukleotid TRA-1 kötőhelyét néhány konzervált pozícióban megváltoztatva (mutáns *xol-1* oligonukleotid) nem képződött komplex. Csak az intakt kötőhelyet tartalmazó jelöletlen promóter fragment kompetált a jelölt próbával a TRA-1 kötésért.

CGA CGA A” (aláhúzva a változás helye). Ezt a mutáns oligonukleotidot használva nem volt kimutatható a fehérje–DNS interakció (18. ábra). A prediktált TRA-1A szekvenciát tehát specifikusan kötötte a fehérje. A kötés specifikusságát kompetíciós analízissel igazoltam. Ebben a kísérletben radioaktívan jelölt vad típusú kötőhelyet tartalmazó oligonukleotid TRA-1A kötési képességét vizsgáltam jelöletlen (hideg) oligonukleotidok hozzáadása mellett. A hozzáadott vad típusú hideg oligonukleotid sikeresen kompetálta a jelölt DNS-t, ezzel szemben a jelöletlen mutáns oligonukleotidok jelenléte nem befolyásolta a jelölt oligonukleotidok kötődési képességét (18. ábra). Ezek alapján elmondható, hogy a TRA-1A fehérje szekvencia specifikusan képes kötődni a *xol-1* gén promóteréhez *in vitro*.

6.2.2. A TRA-1A fehérje gátolja a *xol-1* gén transzkripcióját az XX hermafrodita állatokban

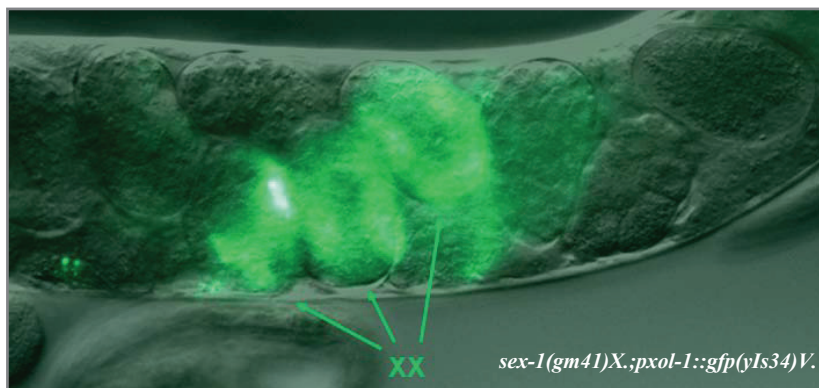
A TRA-1A fehérje *xol-1* promóterhez történő *in vitro* kötési eredményeket *in vivo*



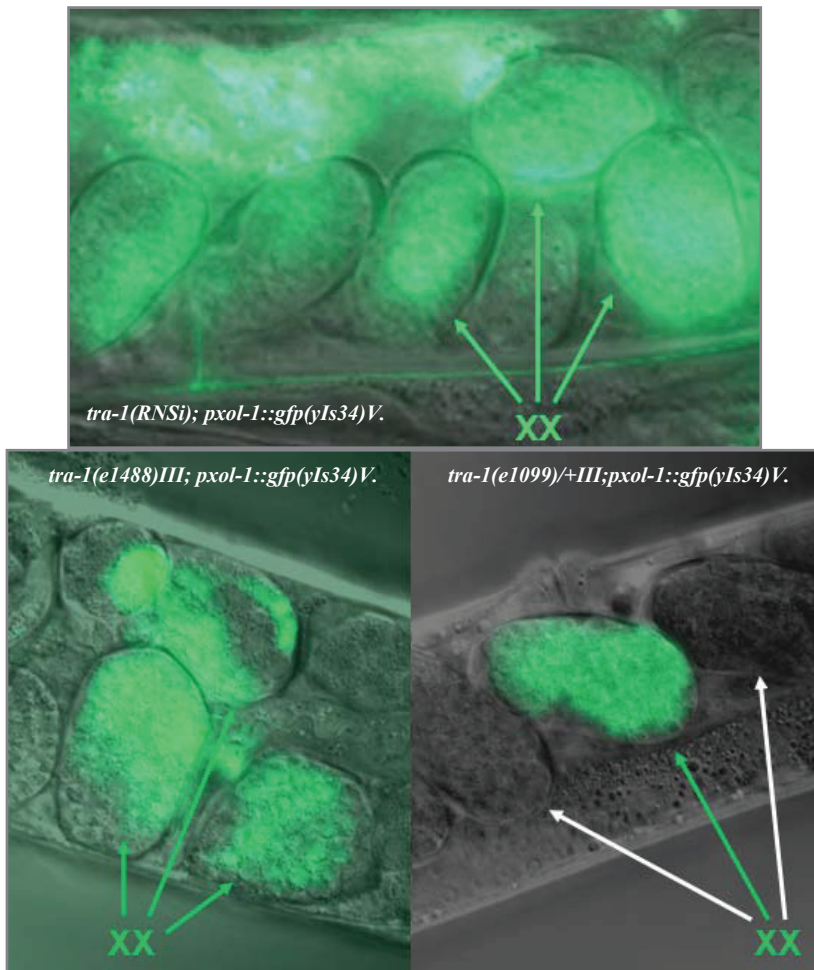
19. ábra. A *xol-1* gén promóterét tartalmazó riporter konstrukció (*yIs34*) az XO him embriókban fejeződik ki. A *him-8* gén funkcióvesztéses mutációja fokozott kromoszóma szét-nem-válást (*non-disjunction*) okoz (Phillips és mtsi., 2005), ezáltal nagy gyakorisággal him kariotípusú (XO) embriók jelennek meg. A fehér nyílak a riportert represszált állapotban tartó XX embriókat jelölik, a zöld nyílak pedig az XO him embriókat jelölik, amelyek kifejezik a zöld fluoreszcens fehérjét. Az ábrák a Nomarski és fluoreszcens képek egymásravezítésével készültek.

kísérletekben is teszteltem. A kísérletekhez a *xol-1* gén promóterének GFP-vel fúzionáltatott riporter konstrukcióját használtam (Nicoll és mtsi., 1997). A *pxol-1::gfp* (*yIs34*) transzgén kizárólag az XO (hím) embriók sejtjeiben fejeződik ki az embrionális fejlődés korai szakaszában (Nicoll és mtsi., 1997) (19. ábra). Ezzel szemben az *yIs34* riporter nem expresszálódik az XX (hermafrodita) embriókban (19. ábra). Ez összhangban van azzal az ismerettel, miszerint a *xol-1* hímeiben aktív, míg hermafroditáiban represszált.

Az XSE elemként ható SEX-1 fehérjéről kimutatták, hogy a hermafroditák XX sejtjeiben gátolja a *xol-1* gén transzkripcióját (Carmi és mtsi., 1998). Ezzel konzisztensen a *sex-1(gm41)* és *sex-1(y263)* funkcióvesztéses mutáns állatokban a *pxol-1::gfp* transzgén ektopikusan expresszálódott (20. ábra). *sex-1* funkcióvesztéses mutáns genetikai háttérben tehát a *xol-1* hiperaktiválódik. A kötőhelyszekvenciák megléte és az *in vitro* kötés alapján a *tra-1*-ről feltételezhető, hogy a *sex-1*-hez hasonlóan gátolja a *xol-1* expresszióját XX embriókban. Valóban, a *tra-1* RNS interferenciával történt csendesítésének hatására az *yIs34* transzgén a kezelt állatok XX embrióiban is ektopikusan expresszálódott (21. ábra). Hasonló *xol-1* de-represszióra utaló eredményeket kaptam funkcióvesztéses *tra-1* mutáns állatokban is. A *pxol-1::gfp* transzgén ektopikusan expresszálódott *tra-1(e1488)* hipomorf és *tra-1(e1099)* funkcióvesztéses (genetikai null) mutáns XX embriókban (21. ábra). Az *e1488* mutáns allél részleges ivari transzformációt (interszex fenotípust) okoz XX állatokban. Ezek az állatok részben női (vulva struktúra, hermafrodita gonád), részben hím (farki pároszerv, hím



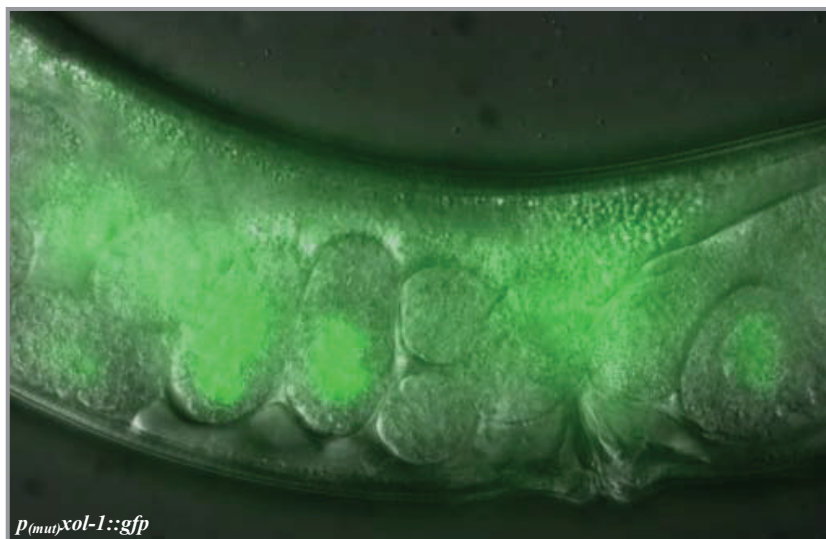
20. ábra. A *sex-1* gén aktivitása gátolja a *xol-1* expresszióját XX embriókban. A *xol-1* gén promóterét tartalmazó riporter konstrukció [*pxol-1::gfp*(*yIs34*)] ektopikusan expresszálódik *sex-1* funkcióvesztéses mutáns XX hermafrodita embriókban. Az ábra a Nomarski és fluorescens felvételek egymásravezítésével készült.



21. ábra. A *tra-1* gén aktivitása gátolja a *xol-1* expresszióját az XX embriókban. A *xol-1* gén promóterét tartalmazó riporter konstrukció ectopikusan expresszálódik *tra-1* funkcióvesztéses XX embriókban. A felső képen egy *tra-1(RNSi)* hermafrodita állat látható, amelyben az XX embriókban de-represszálódott a riporter gén. A lenti baloldali képen egy *tra-1* hipomorf mutációra homozigóta hermafrodita, az alsó jobboldali képen egy *tra-1* nullmutációra heterozigóta hermafrodita látható. A zöld nyilak a homozigóta mutáns, a fehér nyilak a heterozigóta vagy vad típusú XX embriókat jelölik. Az ábrák a Nomarski és fluoreszcens felvételek egymásravezítésével készültek.

párosodási aktivitás) jellegzetességeket mutatnak és homozigóta formában fenntarthatók. A 21. ábrán látható, hogy egy felnőtt homozigóta *tra-1(e1488)* mutáns hermafrodita testében az összes megfelelő korú XX embrió kifejezi a *xol-1* transzgént. Az *e1099* mutáns allél teljes ivari transzformációt okoz, aminek következtében az XX kariotípusú állatok hímekké fejlődnek. Mivel tiszta genetikai vonal nem hozható létre belőlük, ezért ezt a mutáns allélt heterozigóta formában tartottam fenn [*tra-1(e1099)/dpy-18 (e1096)*]. A *tra-1(e1099)* heterozigóta hermafroditákban a *tra-1(1099)* homozigóta embriók GFP pozitívak voltak, míg a heterozigóta és a vad típusú embriókban nem volt detektálható expresszió (21. ábra). A *fem-3* gén RNS interferenciával vagy mutációval (pl. az *e2006* allél használatával) történő inaktiválása *tra-1* funkciónyerést okoz (Hodgkin, 1986). Ezzel konzisztensen *fem-3* deficiens genetikai háttérben nem lehetett kimutatni az *yls34* riporter gén expresszióját az XX embriókban.

A TRA-1A fehérje hiánya tehát a *pxol-1::gfp [yls34]* riporter ektopikus expressziójához vezet XX embriókban, míg a *tra-1* hiperaktiválása nem volt hatással a transzgén kifejeződésére. Ezek az eredmények azt a feltételezést támasztják alá miszerint a TRA-1 gátolja a *xol-1* gén transzkripcióját. A *xol-1* promótert tartalmazó riporter ektopikus



22. ábra. A TRA-1 kötőhely hiánya a *xol-1* promóter derepresszálásához vezet az XX embriókban. A mutáltatott TRA-1-kötőhelyet tartalmazó riporter konstrukció ektopikusan expresszálódik az XX embriókban.

kifejeződése *tra-1(-)* mutáns XX embriókban a gátlás megszüntével magyarázható.

A gátló kölcsönhatás további igazolására egy $p_{(mut)}xol-1::gfp$ riporter transzgénét hoztam létre, amely csupán annyiban különbözött az eredeti *pxol-1::gfp* konstrukciótól, hogy meg lett változtatva benne a TRA-1A fehérje kötőhelyének szekvenciája (a vad típusú „GAC CAC ACA CGA CGA A” helyett: „GGT ACC ACA CGA CGA A”). A transzgénikus állatok létrehozásával *in vivo* is vizsgálhatóvá vált a TRA-1A fehérje hiányának hatása a *xol-1* kifejeződésre. A várakozásoknak megfelelően a mutáns riportert hordozó XX embriók GFP-pozitívak voltak (22. ábra). A TRA-1A fehérje a kötőhely hiányában tehát nem volt képes gátolni a *xol-1* transzgén expresszióját *in vivo*.

6.2.3. A hiperaktív *xol-1* fenotípus kifejeződése függ a *tra-1* gén működésétől

A SEX-1 fehérje gátolja a *xol-1* aktivitását (Carmi és mtsi., 1998). A *sex-1* inaktiválása az XX hermafroditákban ~30% embrionális életképtelenséget eredményez, míg a túlélő állatok Dpy (*Dumpy*, tömzsi test) fenotípust mutatnak (Carmi és mtsi., 1998). Ez a pleiotróp fenotípus a *sex-1* gátló hatásának megszűnéséből származó ektopikus *xol-1* expresszióval magyarázható. A XOL-1 fehérje gátolja a dóziskompenzációt, amely abnormális mennyiségű X-kromoszómás géntermékeket eredményez az XX kariotípusú embriókban (Nicoll és mtsi., 1997; Carmi és mtsi., 1998). Eddigi eredményeim azt mutatták, hogy a *tra-1* ugyancsak gátolja a *xol-1* aktivitását. Ennek alapján azt feltételeztem, hogy a *tra-1* hiperaktivitása csökkenti (szuppresszálja) a hiperaktív *xol-1* által okozott XX-specifikus embrionális életképtelenséget. Ezért megvizsgáltam, hogyan befolyásolja a *tra-1* aktivitás változása a *sex-1* mutáns embriók életképtelenségét.

Megállapítottam, hogy a *tra-1* funkcióvesztéses mutáns állatok szintén jelentős embrionális letalitást mutatnak: 25°C-on a *tra-1(e1488)* mutáns embriók 41,4%-a, míg a *tra-1(e1099)* mutáns embriók 47,9%-a pusztult el (3. táblázat). Ezek az értékek összevethetők a *sex-1(gm41)* és *sex-1(y263)* mutánsokban megfigyelt embrionális életképtelenség értékekkel (3. táblázat). *tra-1(-); sex-1(-)* kettős mutáns állatokban az egyszeres mutánsok embrionális életképtelensége összeadódott (3. táblázat); azonos körülmények között tartott kettős mutánsok embrionális letalitása minden esetben jelentősen megemelkedett az egyes mutánsokhoz viszonyítva. Ez arra utal, hogy a *tra-1* és *sex-1* gének azonos szinten hatva, de parallel szabályozzák (gátolják) a *xol-1* aktivitását (3. táblázat). A *tra-1* hiperaktivitás hatását

Hermafroditák genotípusa	Hőmérséklet (°C)	Embriók száma	Homozigóta mutáns embriók várt száma	Felnőtt utódok száma	Homozigóta felnőtt utódok száma	Homozigóta mutáns embriók letalitása	p<
vad típus	20	97	97*	97	97*	0,0	-
vad típus	25	91	91*	90	90*	0,9	-
<i>tra-1(e1488)/+</i>	20	1634	409	1449	300	26,7	0.001
<i>tra-1(e1488)/+</i>	25	629	157	490	92	41,4	0.001
<i>tra-1(e1099)/+</i>	20	160	40	153	29	27,5	0.001
<i>tra-1(e1099)/+</i>	25	566	142	481	74	47,9	0.001
<i>tra-1(e1575gf)/+</i>	20	334	251**	324	242	3,6***	0.03
<i>tra-1(e1575gf)/+</i>	25	117	88**	110	83	5,7***	0.001
<i>fem-3(e2006)</i>	20	376	376	326	326	13,3	0.001
<i>fem-3(e2006)</i>	25	97	97	77	77	20,6	0.001
<i>sex-1(gm41)</i>	20	419	419	202	202	51,8	0.001
<i>sex-1(gm41)</i>	25	325	325	179	179	44,9	0.001
<i>sex-1(gm41); tra-1(e1488)/+</i>	20	871	218	317	46	78,9	0.001
<i>sex-1(gm41); tra-1(e1488)/+</i>	25	699	175	396	40	77,1	0.001
<i>sex-1(gm41); tra-1(e1099)/+</i>	20	59	15	17	2	86,7	0.001
<i>sex-1(gm41); tra-1(e1099)/+</i>	25	283	71	159	6	91,5	0.001
<i>sex-1(gm41); fem-3(e2006)</i>	20	878	878	683	683	22,2	0.001
<i>sex-1(gm41); fem-3(e2006)</i>	25	133	100	96	96	27,8	0.001
<i>sex-1(gm41); tra-1(e1575gf)/+</i>	20	135	101	101	91	10,1	0.001
<i>sex-1(gm41); tra-1(e1575gf)/+</i>	25	135	101	110	95	6,2	0.001
<i>sex-1(y263)</i>	20	372	372	227	227	39,0	0.001
<i>sex-1(y263)</i>	25	535	535	367	367	31,4	0.001
<i>sex-1(y263); tra-1(e1488)/+</i>	20	NA	NA	NA	NA	NA	-
<i>sex-1(y263); tra-1(e1488)/+</i>	25	394	99	301	49	50,5	0.001
<i>sex-1(y263); fem-3(e2006)</i>	20	575	575	385	385	33,0	0,00
<i>sex-1(y263); fem-3(e2006)</i>	25	160	160	119	119	25,6	0,00
<i>dpy-21(e428)</i>	20	136	136	72	72	47,1	0.001
<i>dpy-21(e428)</i>	25	147	147	101	101	31,3	0.001
<i>dpy-21(e428); tra-1(e1488)/+</i>	20	402	101	231	52	48,5	NS
<i>dpy-21(e428); tra-1(e1488)/+</i>	25	212	53	90	21	60,4	0.001
<i>dpy-21(e428); tra-1(e1099)/+</i>	20	207	52	72	6	88,5	0.001
<i>dpy-21(e428); tra-1(e1099)/+</i>	25	560	140	303	57	59,3	0.001

3. táblázat . A *tra-1* gén inaktiválása növeli, míg hiperaktivitása csökkenti a *xol-1* fokozott működéséből származó embrionális életképtelenséget. A p-érték kiszámításához az „unpaired t” teszt módszert alkalmaztuk (Altman, 1991). Jelölések: A, nincs adat; NS, nem szignifikáns. *homozigóta vad típusú állatok, **feltételezett homo- vagy heterozigóta állatok (*e1575* domináns funkciónyeréses allél), ***legalább egy *e1575* allélt hordozó embrió.

fem-3(e2006) funkcióvesztéses mutánsokban (a *fem-3* gátolja a *tra-1*-et) és *tra-1(e1575)* funkciónyeréses mutánsokban vizsgáltam. Mind a *fem-3(e2006)* mutáció, mind a *tra-1(e1575)* mutáció jelentősen szuppressálta a *sex-1* funkcióvesztéses mutációk által okozott – *xol-1* hiperaktivitásban megnyilvánuló – embrionális letalitást (3. táblázat). Ez magyarázható azzal, hogy a TRA-1 gátolja *xol-1*-et, így csökkenti a *sex-1* mutánsokban megnyilvánuló *xol-1* hiperaktivitás dóziskompenzációra gyakorolt gátló hatását. A megnövekedett *tra-1* aktivitásnak köszönhetően tehát *sex-1* mutáns XX embriókban mérséklődött az X-géntermékek túlzott dózisa.

A XOL-1 gátolja a dóziskompenzációs komplexet (Meyer, 2005). Ezért a következőkben egy, a dóziskompenzációban közvetlenül résztvevő faktor vizsgálatát végeztem el. A *dpy-21* gén a dóziskompenzációs komplex egyik komponensét kódolja (Yonker és Meyer, 2003). A *dpy-21(e428)* funkcióvesztéses mutáns XX embriók jelentős mértékű embrionális letalitást mutattak (3. táblázat). *tra-1* funkcióvesztéses mutáns genetikai hátterekben tovább fokozódott a *dpy-21* mutánsok embrionális életképtelensége (3. táblázat).

Vajon a *tra-1* funkcióvesztéses mutáns embriók az ektopikus *xol-1* expresszió miatt pusztultak el? Ennek a fontos kérdésnek a tisztázáshoz hím állatokban inaktiváltam a *xol-1*-et. A *xol-1* RNS interferenciával történő csendesítése nem vezetett XO-specifikus letalitáshoz, feltehetően az RNSi gyenge, hipomorf hatása miatt (nem közölt adatok). Az *xol-1* RNSi

Hermafroditák genotípusa	RNSi	Embriók száma	Homozigóta mutáns embriók letalitása (%)	p<
vad típus	kontroll	151	3	-
vad típus	<i>xol-1</i>	234	6	-
<i>tra-1(e1099/+)</i>	kontroll	167	27	0.001
<i>tra-1(e1099/+)</i>	<i>xol-1</i>	198	13	0.001
<i>sex-1(gm41)</i>	kontroll	308	64	0.001
<i>sex-1(gm41)</i>	<i>xol-1</i>	346	49	0.001
<i>sex-1(y263)</i>	kontroll	192	37	0.001
<i>sex-1(y263)</i>	<i>xol-1</i>	152	26	0.001

4. táblázat. A *xol-1* gén csendesítése szuppressálja a *sex-1* és *tra-1* mutánsok XX-specifikus embrió letalitását.

Hermafroditák genotípusa	Embriók száma	Homozigóta mutáns embriók letalitása (%)	p<
vad típus	> 2000	2	-
<i>xol-1(y9)</i>	117	39	0.001
<i>tra-1(e1488/+)</i>	1634	27	0.001
<i>tra-1(e1099/+)</i>	160	28	0.001
<i>tra-1(e1488)/+; xol-1(y9)</i>	73	23	0.001
<i>tra-1(e1099)/+; xol-1(y9)</i>	70	11	0.001
<i>sea-2(RNAi)</i>	94	4	-
<i>tra-1(e1099)</i> [kontroll RNSi]	163	35	0.001
<i>tra-1(e1099/+); sea-2(RNSi)</i>	198	25	0.001

5. táblázat. A *xol-1(y9)* mutáns allél, illetve a *xol-1*-et aktiváló *sea-2* gén inaktiválása során szuppresszálódik *tra-1* mutánsok XX-specifikus embrió letalitása.

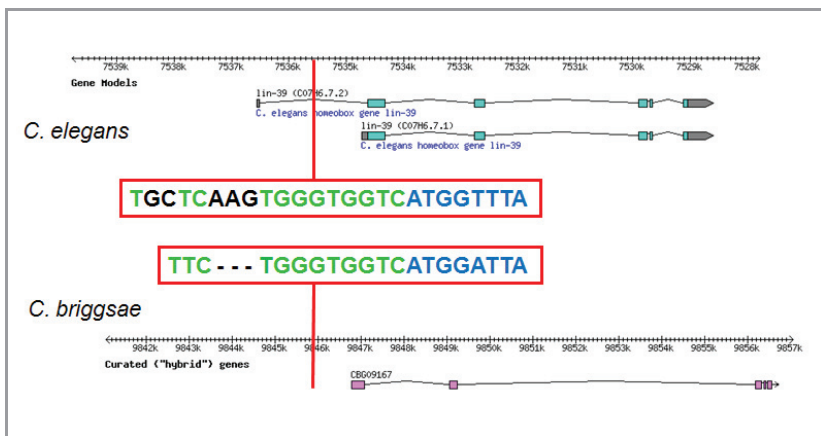
szignifikánsan szuppresszálta a *sex-1* és *tra-1* funkcióvesztéses mutánsok XX-specifikus letalitását (4. táblázat). Hasonló hatást sikerült kimutatni a *xol-1(y9)* mutáns alléllal való keresztezések során, illetve *xol-1* gént aktiváló autoszómás faktorok, így például a *sea-1* és *sea-2* gének inaktiválása során is (5. táblázat).

A *tra-1* funkcióvesztés által okozott embrionális letalitás XX-specifikus voltát *him-8(e1489)* mutánsok vizsgálatával igazoltam. A *him-8(e1489)* hermafroditák csíravonalában jelentkező gyakori kromoszóma non-diszjunkció következményeként az alaptörzsben az utódok 35,7%-a volt hím (XO kariotípusú állat). Ez az arány 46,9%-ra növekedett *tra-1* RNSi genetikai háttérben, ami arra utal, hogy az embrionális letalitás elsősorban az XX embriókat érinti. Közvetett bizonyítékként *tra-1(RNSi)* hermafroditák és X kromoszómára integrálódott GFP riporter konstrukciót (*bIs1*; Grant és Hirsh, 1999) hordozó hímek lettek összekeresztelve. A fejlődésben megrekedt F1 embriók közül 20-ból 16 esetben sikerült azonosítani a transzgénikus apától örökölt *gfp* jelenlétét a PCR-alapú genotipizálás során. A *tra-1* RNSi okozta letalitás tehát az XX embriókat fokozottan érintette.

6.3. A TRA-1A fehérje transzkripcionálisan gátolja a *lin-39* gént

6.3.1. A TRA-1A kötődik a *lin-39/Hox* gén szabályozó régiójához *in vitro*

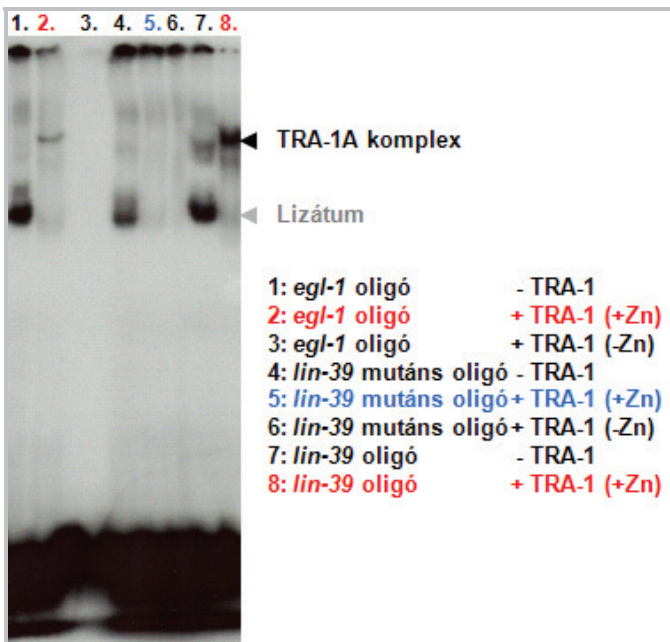
A *C. elegans* genomban folytatott TRA-1A kötőhely keresés során azonosítottam egy potenciális TRA-1A kötőhelyet a *lin-39/Hox* gén promóterében, mintegy 1 kb távolságra a



23. ábra. TRA-1A kötőhely a *lin-39* gén promóterében. A kép felső részén a *C. elegans lin-39* génjének, míg az alsó részén a *C. briggsae lin-39* ortológjának genomi környezete látható. A szekvenciákban belül zöld színnel jelöltem a kötőhely konzervált pozícióit, feketével a prediktált szekvenciától eltérő nukleotidokat, míg kékkkel a kötőhelyet határoló konzervált szekvenciát.

transzlációs starthely előtt. A *lin-39* gén egy HOX fehérjét kódol, melynek *Drosophila* homológjai a *Deformed* illetve *Sex combs reduced*, míg humán megfelelője a *HoxB1* (Clark és mtsi., 1993; Wang és mtsi., 1993). A LIN-39 fehérje szerepe nélkülözhetetlen a vulvafejlődés folyamata során (Alper és Kimble, 2002). A feltételezett kötőhely hasonló pozícióban konzerváltan kimutatható volt a közel rokon *Caenorhabditis briggsae lin-39* ortológ génjének promóterében is (23. ábra).

Hogy igazolni tudjam a *lin-39* gén promóterében talált TRA-1A kötőhely funkcionális voltát, fehérje–DNS kötési (–EMSA vagy *bandshift*) kísérleteket végeztem el. Ezek során *in vitro* termeltetett TRA-1A fehérjének a potenciális kötőhelyet tartalmazó DNS fragmentumhoz történő kötődési képességét vizsgáltam. Pozitív kontrollként az ismert TRA-1 transzkripció célgén *egl-1* kötőhelyét használtam (Conradt és Horvitz, 1999) (24. ábra). A *lin-39* gén genomi környezetében talált kötőhelyet tartalmazó oligonukleotidokat használva szintén képződött DNS–fehérje komplex. Abban az esetben viszont, amikor a *lin-39* oligonukleotid TRA-1 kötőhelyét (vad típusú oligonukleotid: TCA AGT GGG TGG TC) négy konzervált pozíciójában megváltoztattam (mutált oligonukleotid: TCA AGT GGG TAC CG), nem képződött fehérje–DNS komplex (24. ábra). Ennek tükrében elmondható, hogy



24. ábra. Az *in vitro* transzlált TRA-1A fehérje szekvencia-specifikusan kötődik a *lin-39* promóterhez. A pozitív kontrollként használt *egl-1* transzkripció célgén, illetve a *lin-39* gén promóterében talált feltételezett kötőhelyet tartalmazó oligonukleotid esetében képződött DNS–fehérje komplex. A *lin-39* oligonukleotid TRA-1A kötőhelyét néhány konzervált pozícióban megváltoztva nem képződött fehérje–DNS komplex. A Zn^{2+} ion (Zn) a TRA-1A DNS-kötő funkciójához szükséges.

a TRA-1A fehérje szekvencia-specifikusan képes kötődni a *lin-39/Hox* gén promóteréhez *in vitro*, hiszen a DNS–fehérje kölcsönhatáshoz szükséges és elégséges volt az intakt vad típusú kötőszekvencia.

6.3.2. A *tra-1* gén aktivitása befolyásolja a *C. elegans* vulva mintázatképződését

A *tra-1* gén rendellenes működésének vulvafejlődésre gyakorolt hatása Szabó Emese doktori disszertációjának (2010) is részét képezi. Ebben az alfejezetben összefoglalom azokat az eredményeket, amelyek a közös munkánkból a jelen dolgozat témájához tartoznak.

A hermafrodita fonálféregben a *lin-39/Hox* gén egyik funkciója a vulva szövet fejlődésének szabályozása: a *lin-39* aktivitás hiánya a vulva fejlődés elmaradását (*Vulvaless* fenotípus), hiperaktivitása ektoikus vulva indukciót (*Multivulva* fenotípus) eredményez (Eizinger és Sommer, 1997; Takács-Vellai és mtsi., 2007). A *tra-1* gén csökkent aktivitása a hermafroditák szomatikus sejtjeinek maszkulinizációját okozza, aminek expresszivitása a gén inaktíválásától függ (Hodgkin, 1987). Mivel a *tra-1* funkció teljes hiánya (genetikai null mutánsokban) a szómát teljesen hím-típusúvá transzformálja, ezek az állatok hím pároszervvel és farki struktúrával rendelkeznek. A hipomorf *tra-1(e1488)* mutációra homozigóta állatok azonban interszex fenotípusúak: a felnőtt állatok esetében a gonád és intesztinális sejtek női, míg a test többi része – a farki pároszerv, az izomzat és az idegrendszer – hím jellegzetességeket mutat (Hodgkin, 1993).

Mivel a TRA-1A képes a *lin-39* szabályozó régióhoz kötődni *in vitro*, megvizsgáltuk a *tra-1* funkcióvesztéses mutáns állatok vulva morfológiáját (a vulva a hermafrodita állatok egyik legtipikusabb szex-specifikus szerve). A *tra-1(e1488)* mutáns hermafrodita állatokban csak 37%-ban alakul ki vulvaszövet. Ezek az állatok jellegzetes vulvafejlődési defektust mutattak: a vulva sejtorsok abnormális mintázatának következtében a kifejlett vulvaszövet gyakran kitüremkedett a test ventrális síkjából (Pvl – *Protruded vulva* – kitüremkedő vulva fenotípus).

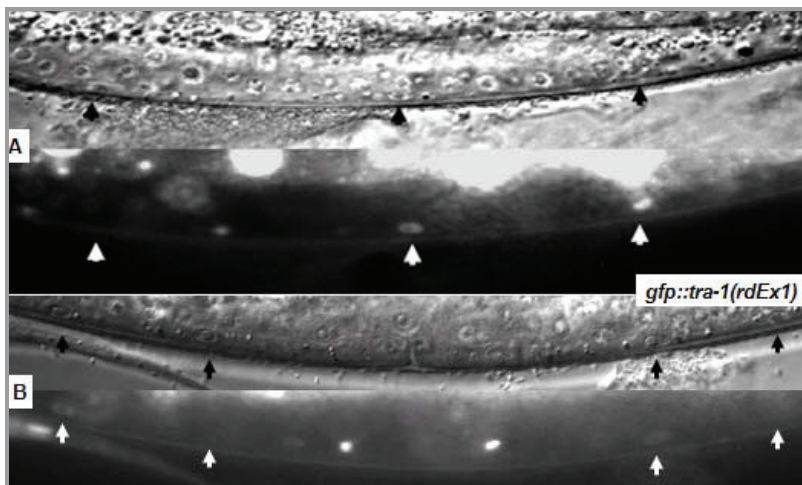
Az EGL-17 fehérje a másodlagos vulvasejtsors specifikus markere az L4 lárvastádium elején (Burdin és mtsi., 1998). Egy *egl-17::gfp* riporter konstrukció használatával sikerült igazolni a *tra-1* mutánsokban megfigyelhető rendellenes vulva fenotípus okát: *tra-1(e1488)* mutáns L4 lárvákban a P(5,7).p sejtek nem voltak képesek a másodlagos vulva sejtors kialakítására (Szabó Emese doktori disszertációja, 2010).

A vulva sejtorsok specifikációját megvizsgáltuk *tra-1* géncsendesített állatokban is. Ehhez három különböző RNSi konstrukciót hoztunk létre, amelyek közül kettő (a „*tra-1*” és „*tra-lab*”) az Y47D3A.6 kódoló régióról átiródó mindkét (*a* és *b*) transzkriptumot csendesíti, míg a „*tra-la*” jelű csak a *tra-la* transzkriptumra specifikus. Mindkét *tra-1* transzkriptum egyidejű csendesítése (*tra-lab* RNSi) kitűnően fenokopizálta a *tra-1(e1488)* mutáns fenotípust: 25°C-on a *tra-1(RNSi)* egyedek jelentős hányada (97.95%, n=295) interszex állattá fejlődött, melyek mintegy 7%-a mutatott Pvl fenotípust. A nem-interszex *tra-la(RNSi)* hermafroditák csupán 2%-a lett interszex, de ezek 27%-a szintén Pvl fenotípust mutatott (Szabó Emese doktori disszertációja, 2010, Szabó és mtsi., 2009). Mivel a két *tra-1* transzkriptum együttes inaktíválása fokozottan befolyásolta a vulva mintázatképződését, mindkét *tra-1* izoformának szerepe lehet a vulva fejlődése során.

6.3.3. A TRA-1A fehérje a vulva prekurzorsejtekben akkumulálódik a vulva indukciót megelőzően és az indukció alatt

A vulvaindukció során a laterális szignál aktiválja a LIN-12/Notch útvonalat a P5.p és P7.p vulva prekurzorsejtekben, így jelölve ki azok másodlagos vulva sejtorsát (Greenwald és mtsi., 1983; Berset és mtsi., 2001). A LIN-12/Notch fehérje akkumulációja a VPC-kben a harmadik lárvastádium közepéig figyelhető meg. A későbbiek során a fehérje szintje az induktív jelátvitel hatására csökken a P6.p sejtben és megnő a P(5,7).p sejtekben (Wilkinson és Greenwald, 1995). Mivel a *lin-39* gén közvetlenül hat a *lin-12* gén expressziójára (Takács-Vellai és mtsi., 2007), felmerült a kérdés, hogy a *tra-1* mutánsok vulva fenotípusa összefüggésbe hozható-e a *lin-39*-közvetítette *Notch*-szabályozással. Ennek megválaszolásához első lépésként megvizsgáltam, hogy a TRA-1 fehérje jelen van-e ezekben a sejtekben a vulvaindukciót megelőzően, illetve a folyamat alatt.

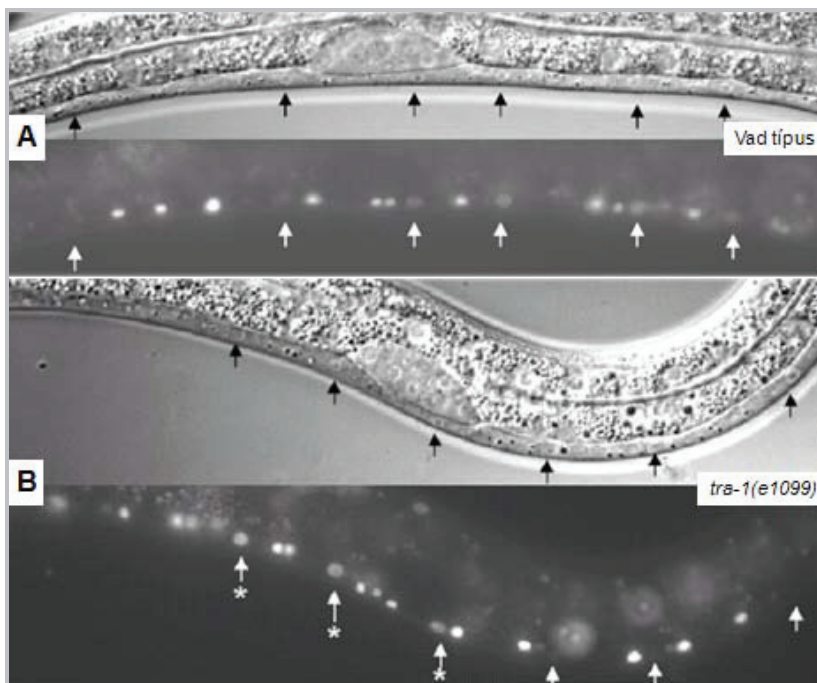
Egy funkcionális *gfp::tra-1 (rdEx1)* extrakromoszómális riporter transzgén (Mathies és mtsi., 2004) expresszióját vizsgálva kimutattam, hogy a zöld fluoreszcens fehérje jelen van a VPC-k



25. ábra. Egy *gfp::tra-1* riporter gén kifejeződik a VPC-kben a vulvaindukció előtt és során is. Az (A) képen a nyilak a vulva prekurzorsejtek pozícióját mutatják egy L3 stádiumú hermafrodita lárvában. A kép felső részén a Nomarski mikrográf, az alsó részen a megfelelő fluoreszcens kép látható. A (B) képen egy késői L3 lárv látható, melynek egyes VPC-i kifejezik a GFP::TRA-1 fehérjét a vulva indukciója során. Látható, hogy a morfológiájuk alapján azonosított VPC-k a vulvaindukció előtt és alatt is expresszálják a *tra-1* riportert.

sejtmagjában a vulva indukció előtt és az indukció ideje alatt is (25. ábra). A riporter ugyan ritkán volt detektálható egyszerre egy adott állat összes VPC-jében, de ennek oka valószínűleg az extrakromozómás transzgén mozaikos expressziója lehetett. A fúziós fehérje a VPC-k osztódása során létrejövő utódsejtekben is megfigyelhető volt. Ezen kívül a vulva felépítésében részt nem vevő, de a vulvafejlődés szabályozásában fontos szerepet betöltő sejtekben (így például egyes hipodermális sejtek sejtmagjában) is kimutatható volt a *tra-1* riporter aktivitása.

6.3.4. A TRA-1A gátolja a *lin-39* riporter gén expresszióját a vulva prekursorsejtekben



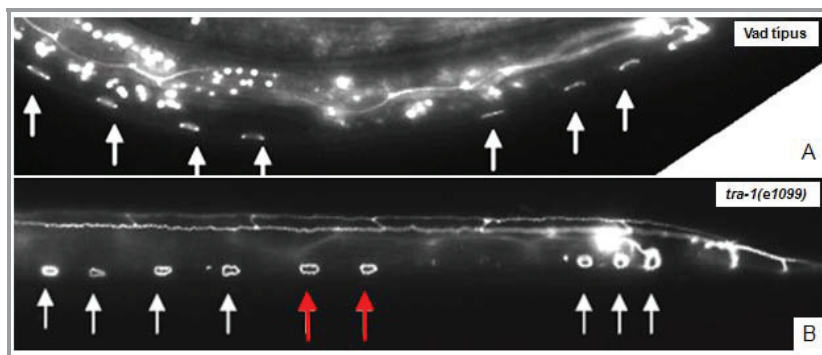
26. ábra. A *lin-39* expressziója fokozódik *tra-1* funkcióvesztés hatására. A *lin-39* gén expressziója Pn.p sejtekben vad XO hím és *tra-1* mutáns XX lárvákban. A vad típusú L2 hím lárvában megfigyelhető alapszintű LIN-39::GFP expresszió (A) jelentősen felerősödik a *tra-1* funkcióvesztéses állatok (B) P(3-8).p sejteiben. A (B) képen egy *tra-1* genetikai nullmutáns állat látható, a nyilakkal jelzett VPC sejtek GFP aktivitása meghaladja a vad típusú állat esetében megfigyelhetőt.

A TRA-1A és a *lin-39* gén promóterében talált potenciális kötőhely közötti kapcsolat *in vitro* igazolása után a kölcsönhatás biológiai funkcióját kívántuk megvizsgálni. Ehhez egy funkcionális *lin-39::gfp* riporter konstrukciót (*zhIs1*) használtam, amelyik a vad típusú L2 stádiumú lárvák esetében a Pn.p vulva prekursorsejtekben fejeződik ki (26A. ábra).

A transzgenikus törzs *tra-1* RNSi kezelése során, illetve a transzgént *tra-1(e1099)* genetikai null-mutáns háttérbe keresztezve a LIN-39::GFP expresszió fokozódását tapasztaltam a P(3-8).p sejtekben (26.B ábra). Ez a megfigyelés a riporter derepressziójára utal, hiszen a transzkripciós faktor, ezzel együtt a gátlás hiánya megmagyarázza a *lin-39* fokozott kifejeződését. Ez alapján feltételezhetjük, hogy *tra-1* transzkripcionálisan, az *in vitro* igazolt kötőhelyen keresztül gátolja a *lin-39* VPC-specifikus expresszióját.

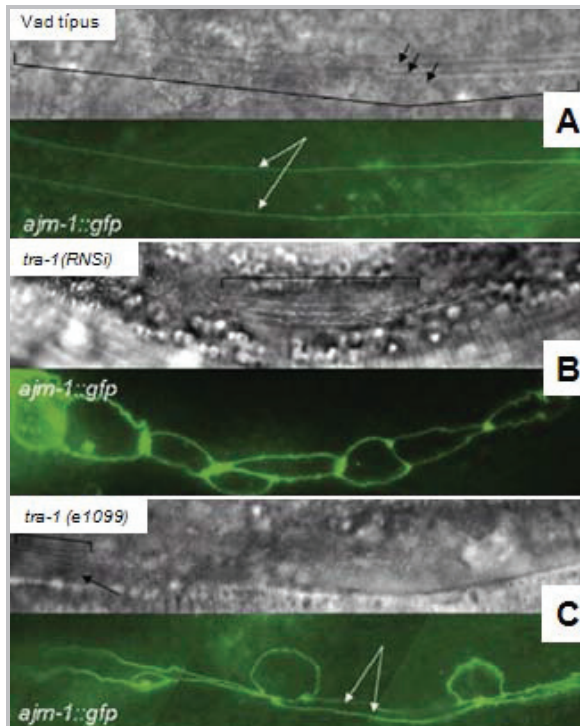
6.3.5. A *tra-1* gén inaktíválása rendellenes sejtfúziót eredményez a vulva és a hipodermisz fejlődése során

A Pn.p sejtek hipodermisszel történő fúziója, illetve az ún. *seam* sejtek szincíciumképzése szintén a *lin-39/Hox* gén által szabályozott folyamatok (Shemer és mtsi., 2004). Megvizsgáltam, vajon a *tra-1* és *lin-39* gének közötti kapcsolat kimutatható-e ebben a folyamatban. A Pn.p sejtek az L1 stádiumú lárvákban alakulnak ki (Sulston és Horvitz,



27. ábra. A *tra-1* befolyásolja a Pn.p sejtek hipodermisszel való fúzióját. (A) *ajm-1::gfp* riporter expressziója egy vad típusú L2 stádiumú hím lárvákban. A fehér nyilak a nem fuzionált Pn.p sejteket mutatják, melyek 4:3-as nem-fúzió mintázatot mutatnak (4 nem fuzionált sejt a test középső részén és 3 nem fuzionált sejt a farki régióban). (B) Nem fuzionált Pn.p sejtek egy *tra-1(e1099)* mutáns lárvában 6:3-as mintázatot mutatnak. A piros nyilak az ectopikusan nem-fuzionált P7.p és P8.p sejteket mutatják.

1977). Ezután vad típusú hímekben a Pn.p sejtek egy része összeolvad a hipodermisszel, de 4 sejt [P(3-6).p] a test középső részén és 3 sejt [P(9-11).p] a farki részen nem fuzionál a hipodermisszel. Ezek az intakt sejtek *lin-12(n147gf)* funkciónyerékes mutáns hímekben ektopikus pseudoduvlákát (vulvaszerű kitüremkedéseket) képesek kialakítani (Greenwald és mtsi., 1983; Alper és Kenyon, 2002). Az *ajm-1::gfp* riporter az adherens kapcsolatok egy komponensére specifikus, amely mintegy körvonalazza a nem fuzionált intakt sejteket (27A. ábra) (Mohler és mtsi., 1998). Ennek köszönhetően lehetőségem nyílt megvizsgálni a *tra-1*



28. ábra. A *tra-1* inaktíválása rendellenes *alae*-képződést okoz. (A) Egy vad típusú felnőtt állat *alae*-ja párhuzamos kutikula kitüremkedésekből áll, melyek megszakítás nélkül futnak végig a test két oldalán (fekete nyilak). Az *alae*-t a *seam* sejtek által alkotott szincícium alakítja ki, melynek körvonalát jelzi az adherens kapcsolatokhoz lokalizálódó AJM-1::GFP riporter (fehér nyilak). (B) Egy *tra-1(RNSi)* és (C) egy *tra-1* funkcióvesztékes mutáns állat, amelyek nem képesek folytonos *alae*-t képezni. Ennek oka az, hogy a *seam* sejtek fúziója nem történt meg (különböző sejteket jelenít meg a zöld színű AJM-1::GFP riporter fehérje).

inaktiválás hatását a Pn.p sejtek fúziójára. *tra-1* funkcióvesztéses mutáns háttérben a nem fuzionált Pn.p sejtek a normális 4:3 helyett gyakran 6:3-as mintázatot mutattak (27B. ábra). Ezekben az álatokban tehát további Pn.P sejtek maradnak fuzionálatlanul ahelyett, hogy beleolvadnának a hipodermiszbe. A P7.p és P8.p sejtek gyakran nem voltak képesek fuzionálni a hyp7 hipodermális szinciummal. A sejtfúzió hiánya 18% és 9% penetranciával volt megfigyelhető *tra-1(e1488)* és *tra-1(e1099)* homozigóta mutáns állatokban.

A következő kísérletben egy másik *lin-39* által szabályozott sejtfúziós eseményt vizsgáltam. A felnőtt fonálféregben mindkét oldalon 16 *seam* sejt fejlődik ki, melyek a differenciáció befejezése után egy folytonos laterális szincíciummá olvadnak össze. Ezek a sejtek, illetve az általuk képzett szincícium felelős az *alae*-knak nevezett hosszanti kutikula kitüremkedések kialakításáért (Shemer és mtsi., 2004). Az *alae*-k lefutása és struktúrája különbözött a vad típusú és a *tra-1* mutáns állatok esetében. A vad típusban az *alae*-k megszakítás nélkül futnak végig az állat két oldalán a *seam* sejtek fölött (28A. ábra). Ezzel szemben *tra-1(RNSi)* állatok, illetve funkcióvesztéses *tra-1* mutánsok esetében gyakran (53%, n=95) elágazó és megszakadt folytonosságú *alae*-k figyelhetők meg (28 B és C. ábrák). Az AJM-1::GFP lokalizációja alapján a kifejlett állatokban is különálló (nem fuzionált) *seam* sejteket azonosítottam. A *seam* sejtek ezen állatokban megfigyelhető fúziós defektusa új *tra-1* funkciót azonosít: a sejtfúzió szabályozását (28 B és C. ábra).

6.3.6. A *tra-1* gén inaktivációja fokozott vulvaindukcióhoz vezet *synMuv AB* kettős mutáns állatokban

A hipodermiszből érkező *synMuv* jel gátolja a vulvasejtek indukcióját. A szintetikus multivulva útvonalak egyes komponensei közvetlenül szabályozzák a *lin-39* gén expresszióját a VPC-kben (Guerre és mtsi., 2007; Maloof és Kenyon, 1998; von Zelewsky és mtsi., 2000). Ismert az is, hogy a *synMuv B* osztályba tartozó gének szerepet játszanak a hermafrodita fejlődés folyamatában (Grote és Conradt, 2006). Ezen információk alapján merült fel az a kérdés, hogy vajon a TRA-1 kölcsönhat-e a *synMuv* útvonalakkal a vulvafejlődés szabályozásában? Először azt vizsgáltam meg, hogy a *tra-1* aktivitás hatással van-e a vulvaindukcióra *synMuv AB* kettős mutáns háttérben. Azt találtam, hogy a *tra-1* csendesítése jelentősen megnöveli az átlagos vulvaszámot *lin-8*; *lin-35*, *lin-8*; *lin-36* és *lin-38*; *dpl-1* *synMuv AB* kettős mutáns hermafroditákban (6. táblázat). Emellett a *fem-3* RNSi-vel, illetve

Genotípus	Átlagos vulvaszám	Vizsgált állatok száma	P-érték
<i>tra-1(RNSi)</i>	0.4	378	–
<i>fem-3(e2006)</i>	1.0	200	–
<i>fem-3(RNSi)</i>	1.0	670	–
<i>lin-8(n111); lin-35(n745) [synMuv AB]</i>	3.3	100	–
<i>lin-8(n111); lin-35(n745); tra-1(RNSi)</i>	4.0	48	0.004
<i>lin-8(n111); lin-35(n745); fem-3(RNSi)</i>	2.7	35	0.0001
<i>lin-8(n111); lin-36(n766) [synMuv AB]</i>	3.5	100	–
<i>lin-8(n111); lin-36(n766); tra-1(RNSi)</i>	4.5	100	0.0001
<i>lin-8(n111); lin-36(n766); fem-3(RNSi)</i>	2.8	100	0.0001
<i>lin-38(n751); lin-36(n766) [synMuv AB]</i>	3.3	100	–
<i>lin-38(n751); lin-36(n766); tra-1(RNSi)</i>	3.9	170	0.0001
<i>lin-38(n751); lin-36(n766); fem-3(RNSi)</i>	3.0	100	0.001
<i>lin-38(n751); dpl-1(n3643) [synMuv AB]</i>	3.3	105	–
<i>lin-38(n751); dpl-1(n3643); tra-1(RNSi)</i>	3.7	36	0.025
<i>lin-38(n751); dpl-1(n3643); fem-3(RNSi)</i>	2.9	100	0.001
<i>lin-15(n767); dpl-1(n2994) [synMuv AB]</i>	4.2	100	–
<i>lin-15(n767); dpl-1(n2994); fem-3(e2006)</i>	3.6	100	0.0001

6. táblázat. A csökkent *tra-1* aktivitás fokozza, míg a hiperaktív *tra-1* csökkenti a vulvaindukció mértékét *synMuv AB* kettős mutánsokban. A *lin-8*, *lin-15* és *lin-38 synMuv A* osztályba tartozó gének, a *dpl-1*, *lin-36* és *lin-35* pedig *synMuv B* gének. A P-érték kiszámításához a hármas mutánsokat vettem össze a megfelelő *synMuv* kettős mutánsokkal.

fem-3 funkcióvesztéses mutációkkal előidézett *tra-1* aktivitás növelés szuppresszálta a vulvaindukciót *synMuv AB* kettős mutáns genetikai hátterekben (6. táblázat).

Az XX kariotípusú *tra-1(e1099)* nullmutáns állatok hímekké fejlődnek. Érdekes módon ezek a fertilis hímmé transzformált állatok is képesek ektopikus vulvaindukcióra *synMuv AB*

Genotípus	Kariotípus	Ivari fenotípus	Átlagos vulvaszám	Vizsgált állatok száma	P-érték
vad típus	XX	hermafrodita	1,00	56	–
vad típus	XO	hím	0,00	100	–
<i>lin-8(n111); lin-35(n745) [synMuv AB]</i>	XX	hermafrodita	3,75	100	–
<i>lin-8(n111); lin-35(n745) [synMuv AB]</i>	XO	hím	0,65	144	–
<i>lin-8(n111); lin-35(n745); tra-1(e1099)</i>	XX	hím	1,21	100	0.0001

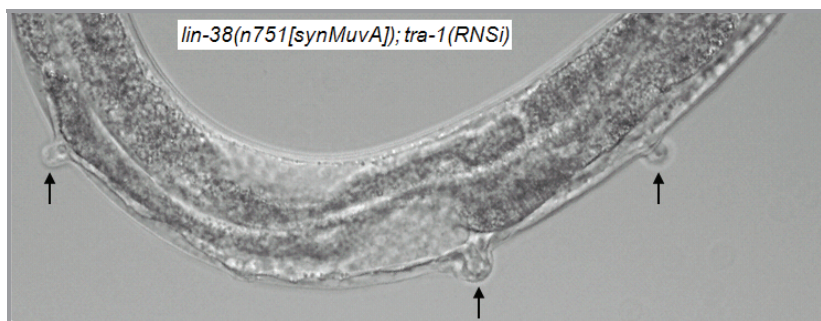
7. táblázat. A *tra-1(e1099)* mutáció növeli a *synMuv AB* kettős mutáns pszeudohímek multivulva fenotípusát. A P-érték kiszámítása kétmintás (*Unpaired*) T-tesztel történt (kettős mutáns hímek lettek összehasonlítva a hármas mutáns állatokkal).

genetikai háttérben (7. táblázat). Ezekben az állatokban megfigyelhető átlagos vulvaszám magasabbnak bizonyult a *synMuv AB* kettős mutáns hímek átlagos vulvaszámánál (7. táblázat). Ez az eredmény a VPC-k fokozott indukciójára utal.

6.3.7. A *tra-1* gén inaktivációja ektopikus vulvaindukciót okoz *synMuv A* mutáns háttérben

A *synMuv AB* kettős mutáns állatokkal végzett kísérletek után azt is megvizsgáltam, hogy vajon a *tra-1* funkcióvesztés mutat-e genetikai kölcsönhatást a különböző *synMuv* osztályokba tartozó egyszeres mutánsokkal (Fay és Yochem, 2007). Először *synMuv A* egyszeres mutáns állatokat kezeltem *tra-1* dsRNS-sel. Meglepő módon a *lin-38(n751)*; *tra-1(RNSi)* és *lin-8(n111)*; *tra-1(RNSi)* állatok szintetikus multivulva fenotípust mutattak (a Muv fenotípus penetranciája 14,3% volt *lin-38(n751)*; *tra-1(RNSi)* állatokban és 2,1% volt *lin-8(n111)*; *tra-1(RNSi)* állatokban) (29. ábra. 8. táblázat). *synMuv B* mutánsokban a *tra-1* inaktiválása nem eredményezett Muv fenotípust (8. táblázat). Ezek az eredmények azt valószínűsítik, hogy a *tra-1* egy *synMuv B* osztályba tartozó gén vagy a *synMuv B* útvonallal kölcsönhatva gátolja a vulvafejlődést.

A további kísérletekhez létrehoztunk egy olyan *tra-1* RNS interferencia konstrukciót, amely mindkét *tra-1* transzkriptumot (*tra-1a* és *tra-1b*) csendesíti, és nem transzformálja hímmé az állatokat. Ez a moderált „*tra-1ab*” RNSi kezelés is Muv állatokat eredményezett



29. ábra. A *tra-1* inaktiválása Multivulva (Muv) fenotípust okoz *synMuv A* mutáns genetikai háttérben. *tra-1* dsRNS kezelés hatására Muv fenotípus alakul ki egy *lin-38* mutáns hermafroditában. A nyilak az ektopikus pseudovulvákat jelzik.

synMuv A mutáns háttérben (8. táblázat).

Végül a *tra-1(e1099)* genetikai null-mutációt *lin-8* és *lin-38* egyszeres mutánsokba keresztezve megvizsgáltam a *tra-1* aktivitás hiányának hatását *synMuv A* genetikai háttérben. A kettős mutáns állatok esetében is megfigyelhető volt az ektopikus vulvaindukció, de – érdekes módon – az RNSi kezelések esetében tapasztaltaknál alacsonyabb penetranciával (8. táblázat). Mivel a *tra-1(e1099)* allélra homozigóta állatok hímek, és így nem képesek önmegtermékenyítésre, ezt az allélt heterozigóta formában tartottam fenn. Ebből következik, hogy a vizsgált *tra-1* homozigóta lárvák az anyai hatás miatt rendelkezhetnek bizonyos mennyiségű TRA-1 fehérjével, ami az egyik lehetséges magyarázat a csökkent szintetikus *Multivulva* fenotípus kialakulására. Alternatív magyarázatként a *tra-1(e1099)* mutáció (majdnem) teljes mértékben maszkulinizálja a ventrális hipodermiszt az XX állatokban, ezért nem képződnek VPC-k (ezek a sejtek specifikusan csak a hermafroditákban differenciálódnak), és ezért nem tud ektopikus vulva indukció kialakulni.

Genotípus	Ivari fenotípus	Multivulva (%)	Vizsgált állatok száma	P-érték
vad típus	hermafrodita	0	>10000	–
vad típus	hím	0	>10000	–
<i>tra-1(e1099)</i>	hím	0	210	–
<i>tra-1(RNSi)</i>	interszex/hím	0	230	–
<i>tra-1ab(RNSi)</i>	hermafrodita	0	100	–
<i>lin-38(n751) [synMuv A]</i>	hermafrodita	0	326	–
<i>lin-38(n751); tra-1(e1099)</i>	hím	0,02	2190	0,01
<i>lin-38(n751); tra-1(RNSi)</i>	interszex	14,3	320	0,0001
<i>lin-38(n751); tra-1ab(RNAi)</i>	hermafrodita	3,8	644	0,0001
<i>lin-8(n111) [synMuv A]</i>	hermafrodita	0	850	–
<i>lin-8(n111); tra-1(e1099)</i>	hím	0,015	2950	0,01
<i>lin-8(n111); tra-1(RNSi)</i>	interszex	2,1	320	0,001
<i>lin-8(n111); tra-1ab(RNSi)</i>	hermafrodita	1,5	395	0,01
<i>lin-35(n745) [synMuv B]</i>	hermafrodita	0	150	–
<i>lin-35(n745); tra-1(RNSi)</i>	interszex	0	889	–
<i>lin-36(n766) [synMuv B]</i>	hermafrodita	0	197	–
<i>lin-36(n766); tra-1(RNSi)</i>	interszex	0	2322	–

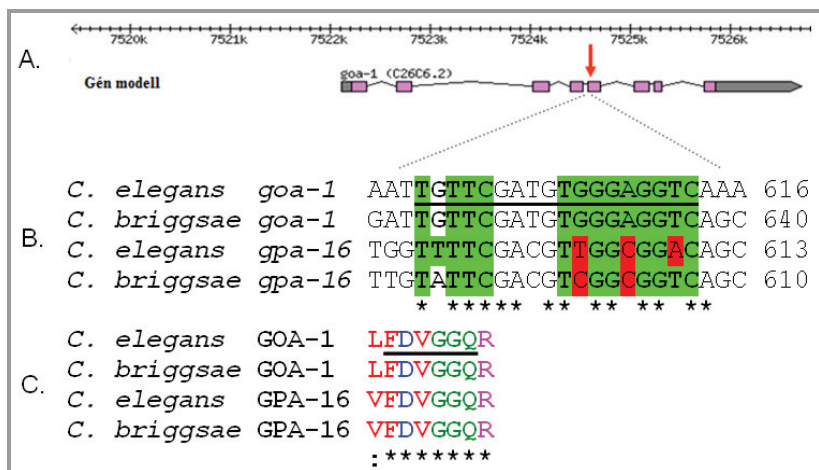
8. táblázat. A *tra-1* gén inaktivációja szintetikus *Multivulva* fenotípus kialakulásához vezet *synMuv A* mutáns háttérben. A statisztikai értékek meghatározása kétmintás (*Unpaired*) T-tesztel történt (kettős funkcióvesztéses mutáns állatok a megfelelő *synMuv A* egyszeres mutánsokkal lettek összehasonlítva).

6.4. A TRA-1A *in vitro* kötődik a *goa-1* gén exoni szekvenciájában található feltételezett kötőhelyhez

6.4.1. TRA-1A kötőhely azonosítása a *goa-1* exoni szekvenciájában

A TRA-1A kötőhelyek genom szintű keresése során azonosítottam egy kötőhelyet a *goa-1* gén exoni szekvenciájában (30.A ábra). A kötőhely konzervált, mivel a *C. briggsae* *goa-1* ortológ esetében is megtalálható és 100%-os egyezést mutat (30.B ábra). Ezzel szemben a *C. elegans* *goa-1* gén tágabb genomi környezete nem mutat evolúciós konzerváltságot ezzel a fajjal (különböznek a szomszédos gének a közeli rokon fajokban), vagyis kizárhattam a lehetőségét annak, hogy a lehetséges kötőszekvencia egy szomszédos gén szabályozó eleme lenne.

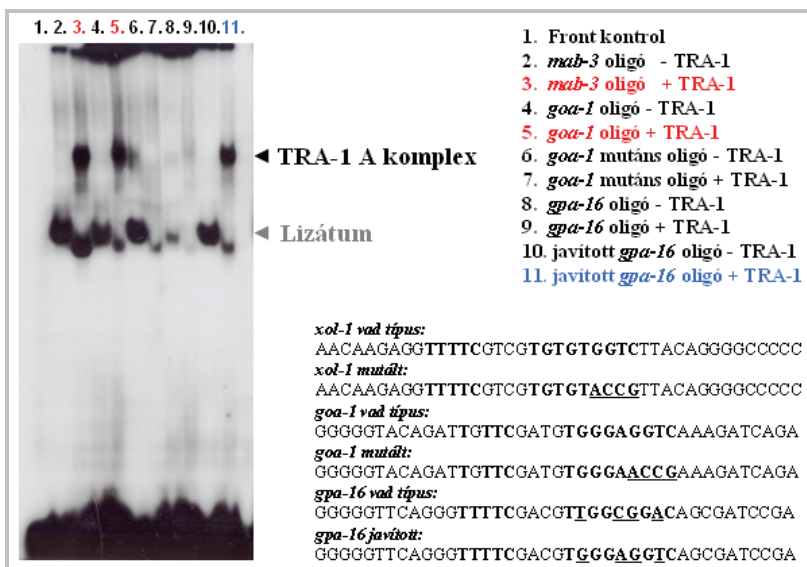
A *goa-1* egy Gi/o típusú Gα alegység ortológot kódol. Érdekes módon a *goa-1* gén ötödik exonjában található TRA-1A kötőhelyként prediktált nukleotid szekvencia magasabb



30. ábra. A *goa-1* génben talált feltételezett TRA-1A kötőhely jellegzetességei. (A) A feltételezett TRA-1A kötőhely a *goa-1* 5. exonjának elején található. (B) Az azonosított szekvencia teljes azonosságot mutat két közel rokon *Caenorhabditis* faj esetében. A nukleinsav szekvencián belül zölddel jelöltem a TRA-1A konszenzus szekvenciával megegyező nukleotidokat és pirossal a nem megengedett változásokat. A *C. elegans* másik Gi/o típusú Gα alegységet kódoló paralóg génje a *gpa-16*, amely nem mutat ilyen erős nukleinsav konzervációt, holott az aminosav sorrend ezen a helyen mindkét paralógból megegyezik (C).

fokú konzervációt mutat a gén ortológjai között, mint a *C. elegans* két Gi/o típusú Ga alegység paralógja (*goa-1* és *gpa-16*) között, holott ezekről a génekről átiródó fehérjéket redundáns funkciójának írták le a receptor-független jelátvitel során (30. B ábra) (Gotta és Ahringer, 2001; Bergmann és mtsi., 2003). A *gpa-16* gén genomai szekvenciájában is megtalálható egy TRA-1A kötőhelyhez hasonló motívum, de ebben a szekvenciában a TRA-1A kötőhely kulcsfontosságú pozíciói nem konzerváltak (30. ábra). Érdekes módon a nukleotid szekvencia különbségei ellenére a TRA-1A kötőhely nukleotidjai által kódolt aminosavak tökéletes egyezést mutattak a *C. elegans* és *briggsae* fajok GOA-1 és GPA-16 fehérjeiben (30. C ábra). Ezek az adatok felvetették a kérdést, vajon a nukleotid szekvencia fajok közötti konzervációja csupán a különbözőképpen evolált exoni lokalizációnak tudható be, vagy valóban egy funkcionális TRA-1A kötőhelyet sikerült azonosítani a *goa-1* esetében?

EMSA kísérletekkel igazoltam, hogy az *in vitro* transzlált TRA-1A fehérje képes kötni



31. ábra. A TRA-1A fehérje képes kötni a *goa-1* 5. exonjában található kötőhelyet *in vitro*. A kötés szekvencia-specifikus, mivel a kötőhely konzervált pozícióinak mutáltatása megakadályozza a DNS-fehérje komplex képződését. A *gpa-16* gén szekvenciájában található homológ szekvencia (amely ugyanazokat az aminosavakat kódolja) nem képes kötni a TRA-1A fehérjét. A *gpa-16* oligonukleotid szekvenciájának megváltoztatása (*goa-1*-szerűvé) funkcionális kötőhelyet eredményezett.

a *goa-1* 5. exonjának prediktált kötőhelyét tartalmazó oligonukleotidot (31. ábra). Nem kaptam fehérje–DNS interakciót viszont abban az esetben, amikor a *goa-1* kötőhelyének négy nukleotidját megváltoztattam a *gpa-16*-nak megfelelő szekvenciára (az oligonukleotid további része megegyezett a *goa-1* genomi környezettel). Abban az esetben sem észleltem kötést, ha a *gpa-16* szekvenciáját tartalmazó oligonukleotidot használtam, viszont képes voltam komplexődést detektálni a *gpa-16* szekvencia ismert TRA-1 kötőhellyé való változtatásával (31. ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TRA-1A fehérje szekvencia-specifikusan képes kötni a *goa-1* esetében azonosított feltételezett kötőhelyét. A lehetséges TRA-1A kötőhely *in vitro* kötési képességének igazolása után a kötés biológiai szerepét vizsgáló kísérletek következtek, ezek azonban már nem képezik részét dolgozatomnak. A *tra-1* és *goa-1* gének közötti genetikai kapcsolat feltárása Kutnyánszky Veronika doktori munkájának feladata lett, akinek szakdolgozati és doktori munkájának irányításában én is közreműködtem.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

Az állati egyedfejlődés során a Hh jelátviteli útvonal alapvető szerepet játszik a sejtnövekedés és a differenciáció szabályozásában (Jiang és Hui, 2008). Abnormális Hh jelátvitel emberben különféle ráktípusok és fejlődési rendellenességek kialakulását okozhatja. A fonálféreg *Caenorhabditis elegans*-ban összefüggő Hh jelátviteli útvonal meglétét eddig nem sikerült igazolni, de a jelátvitel több kulcsfontosságú faktora azonban erősen konzervált módon megtalálható ebben a fajban is (Zugasti és mtsi., 2005). A GLI (GLIoblasztóma asszociált) fehérjecsaldába a Hh jelátviteli útvonal konzervált terminális transzkripciós faktorai tartoznak (Ruiz i Altaba és mtsi., 2007).

A *C. elegans* genomjában egyedül a *tra-1* gén kódol GLI/Ci-típusú transzkripciós faktort. A *tra-1*-nek a szomatikus szex-determinációs génkaszkád terminális tagjaként legfőbb szerepe a női nemi fejlődés biztosítása. Szerepét transzkripciós represszorként azonosították, de eddig csak kevés közvetlen célgénje vált ismertté. Ezek mind a nemi jellegek kialakításában szerepet játszó faktorokat kódolnak: az egyes célgének működése az ivarspecifikus sejthalál szabályozásában, a hímek farki páرزószervének kialakításában, illetve a spermatogenezis folyamatához bizonyult nélkülözhetetlennek (Zarkower, 2006). Fontos fejlődés- és orvosbiológiai kérdés, hogy melyek lehetnek azok a további célgének, amelyek a TRA-1A hatását közvetítik. Munkám során a TRA-1A által közvetlenül szabályozott gének egy genom-szintű keresését végeztem el, ezáltal a Hh jelátviteli útvonal új lehetséges effektor molekuláit azonosítottam. Azon TRA-1A célgének genetikai analízisét, amelyek más jelátviteli útvonalak ismert komponensei, részletesen is elvégeztem. A potenciális kötőhelyek specifikus TRA-1 kötését *in vitro* gélmobilitási (EMSA) kísérlettel vizsgáltam. A DNS-fehérje interakcióra utaló eredményeket megfelelő riporter konstrukciók előállításával és *in vivo* expressziós analízisével erősítettem meg. A *tra-1* és feltételezett célgénjei közötti genetikai kölcsönhatás kimutatása és a szabályozás részleteinek felderítése érdekében pedig kettős mutáns episztázis elemzéseket végeztem el.

7.1. A TRA-1A transzkripciós faktor lehetséges célgénjeinek meghatározása

Az emlősökben a Hh jelátvitel hatása a GLI fehérjék transzkripciós szabályozó működésén keresztül realizálódik. A *C. elegans* GLI ortológ TRA-1A fehérje is transzkripciós

szabályozó aktivitású. Az eddig megismert TRA-1A célgének esetében leírt kötőszekvenciákat alapul véve egy konszenzus kötőhelyet határoztam meg, amely segítségével új lehetséges *tra-1* célgéneket kerestem a *C. elegans* genomban. A kötőhelykeresés során a valószínűsített kötőszekvenciát kerestem a fonálféreg gének szabályozó régiójában. A bioinformatikai analízis során 21 olyan célgén sikerült meghatározni, amelyek esetében a TRA-1A kötőhely egy közeli rokon faj, a *C. briggsae* ortológ génjének genomi környezetében is konzerváltan jelen volt (2. táblázat). A számos érdekes lehetséges célgén között van például a *daf-16* gén, amely egy FOXO ortológot kódol és a nemek közötti élethosszbeli különbségért felelős, illetve több, az ember esetében onkogénekhez köthető génnek *C. elegans* megfelelője (pl. *prk-1* és *abl-1*) (1. táblázat) (Gems és Riddle, 2000). A TRA-1A fehérje és egyes *in silico* prediktált lehetséges célgénjei közötti kapcsolatot további kísérletekkel, *in vitro* és *in vivo* módszereket alkalmazva végeztem el.

7.1.1. A *tra-1* és *xol-1* gének közötti kapcsolat molekuláris vizsgálata

A TRA-1A kötőhely genom szintű *in silico* meghatározása során azonosítottam egy intakt kötőszekvenciát a *xol-1* gén promóter régiójában 154 bázispárnyira a translációs starthely előtt (17. ábra). Ez a kötőhely teljes egyezést mutat a *mab-3* gén esetében leírt TRA-1A kötőhellyel (Yi és mtsi. 2000). A közel rokon *Caenorhabditis* fajok genomi szekvenciáját megvizsgálva megállapítottam, hogy a *C. briggsae* és *C. remanei* fajok esetében is konzerváltan található meg a TRA-1A kötőhelyként prediktált szekvencia a *xol-1* gén ortológjainak genomi környezetében (17. ábra).

EMSA kísérletekkel igazoltam, hogy a teljes hosszúságú TRA-1A fehérje képes kötődni a *xol-1* promóterben található TRA-1A kötőhelyet tartalmazó régióhoz (18. ábra). Pozitív kontrollként egy ismert TRA-1A célgén (*mab-3*) promóterében található kötőhelyet használtam. A *xol-1* promóter elem TRA-1A kötőhelyének megváltoztatása négy konzervált nukleotid cseréjével történt. Ez a mutáns oligonukleotid nem volt képes fehérje–DNS interakcióra. A prediktált TRA-1A kötőhely szekvencia tehát specifikusan kötődik a fehérjéhez. A DNS-kötés specifikus voltát kompetíciós analízissel is igazoltam. Ebben a kísérletben a radioaktívan jelölt vad típusú kötőhelyet tartalmazó oligonukleotid TRA-1A kötési képességét vizsgáltam jelöletlen (hideg) oligonukleotidok hozzáadása mellett. A hozzáadott vad típusú hideg oligonukleotid sikeresen kompetált a jelölt DNS-sel. Ezzel

szemben a mutáns jelöletlen oligonukleotid nem befolyásolta a jelölt oligonukleotid fehérje-kötő képességét.

A TRA-1A transzkripció faktor és *xol-1* promóter *in vitro* kötési eredményeket *in vivo* kísérletekben is teszteltem. A kísérletekben a *xol-1* gén promóterének GFP-vel fúzionáltított riporter konstrukcióját használtam. A *pxol-1::gfp* (*yIs34*) transzgén az XO (hím) kariotípusú embriók sejtjeiben fejeződik ki a fejlődés korai szakaszában. Ezzel szemben az *yIs34* riporter nem expresszálódik az XX (hermafrodita) embriók sejtjeiben. *sex-1(gm41)* és *sex-1(y263)* funkcióvesztéses mutáns XX állatokban a *pxol-1::gfp* transzgén ektopikusan expresszálódik (20. ábra; Carmi és mtsi., 1998). Az *yIs34* riporter tehát nem represszálódik *sex-1* mutáns XX kariotípusú sejtekben. A *tra-1* gén csendesítésének hatására az *yIs34* transzgén a kezelt állatok XX embrióiban ektopikusan expresszálódott (21. ábra). Hasonló eredményt kaptam funkcióvesztéses *tra-1* mutáns állatokban is: a *pxol-1::gfp* transzgén ektopikusan expresszálódott *tra-1(e1488)* hipomorf mutáns és *tra-1(e1099)* null-mutáns XX embriókban (21. ábra). Az XX kariotípusú embriókban a TRA-1A fehérje hiánya tehát a *pxol-1::gfp* riporter ektopikus expressziójához vezet, míg a *tra-1* hiperaktiválása nincs hatással a transzgén kifejeződésére. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a *tra-1* gátolja a *xol-1* transzkripcióját a hermafrodita (XX) embriókban. A *xol-1* promóterét tartalmazó riporter kifejeződése *tra-1(-)* mutáns XX embriókban a gátlás megszűntével magyarázható.

A gátló kölcsönhatás további igazolására létrehoztam egy $p_{(mut)}xol-1::gfp$ riporter transzgént, amely csak annyiban különbözött az eredeti *pxol-1::gfp* konstrukciótól, hogy a TRA-1A fehérje kötőhelyének nukleotid szekvenciája lett megváltoztatva benne. A mutáns riportert hordozó XX embriók GFP-pozitívak voltak (22. ábra). Ez azt jelenti, hogy a TRA-1A kötőhelyet nem tartalmazó *xol-1* promóter ektopikusan aktiválódik XX embriókban. A hermafroditákban jelenlevő TRA-1A fehérje tehát nem képes gátolni a *xol-1* transzgén expresszióját a kötőhely hiányában.

7.1.2. A *tra-1* szerepe a dóziskompenzációban

A *C. elegans*-t speciális ivari dimorfizmus jellemzi: az állat vagy önmegetermékenyítő hermafroditaként vagy hímként fejlődik. A két ivar közti összes anatómiai, fiziológiai és viselkedésszerű különbség a szex-determinációs génkaszkád eltérő működésének köszönhető (Zarkower, 2006). A szex-determinációs útvonal alapvetően egy gátlási lépésekből felépülő génkaszkád, aminek hatása terminális *tra-1* gén aktivításán összegződik. A szomatikus szex-

determinációs útvonalat egy kromoszóma-számláló mechanizmus kapcsolja be azáltal, hogy meghatározza az elsődleges szex-determinációs jelet. Ez a jel az ivari kromoszóma és az autoszóma szettek számaránya, az $X:A$ hányados, ami a hermafroditákban $2X:2A = 1$, a hímekben $1X:2A = 0,5$. A szex-determinációval párhuzamosan az ivari kromoszómák dóziskompensációja biztosítja, hogy az ivari kromoszómához kapcsolt géneknek azonos mennyiségű terméke keletkezzen a különböző nemekben. A *C. elegans* dóziskompensáció a hermafrodita állatokban megy végbe (Chuang és mtsi., 1996). A folyamat során a dóziskompensációs komplex kapcsolódása a felére csökkenti mindkét X kromoszóma génexpressziós szintjét, ami biztosítja, hogy az X kromoszóma géntermékeinek dózisa megegyezik az XX hermafroditák és az XO hímek sejtjeiben. A hermafrodita állatokban a dóziskompensáció hiánya Dpy fenotípust eredményez, valamint XX letalitáshoz vezet (Meyer, 2005).

A dóziskompensációs komplexek kialakulását a *xol-1* az *sdc* gének gátlásán keresztül szabályozza (Meyer, 2005). XOL-1 jelenlétében az *sdc* gének nem tudnak kifejeződni, és emiatt nem alakul ki a dóziskompensációs komplex. A *xol-1* gén működését többek között egy X kromoszómás „numerátor” gén, a *sex-1* gátolja (Carmi és mtsi., 1998), hozzájárulva ezáltal az $X:A$ hányados szex-determinációt és dóziskompensációt befolyásoló hatásához. Hermafrodita állatokban a *sex-1* funkcióvesztése csökkenti a *xol-1* gén gátlását, így az X kromoszómás géntermékek mennyisége megnő. Ennek következtében az *sex-1(-)* mutáns XX hermafroditák jelentős része még embrionális korban elpusztul (XX letalítás).

Megvizsgáltam azt, hogy a *tra-1* aktivitás megváltozásának van-e hatása a XOL-1 túltermelés által okozott embrionális életképtelenségre. Megállapítottam, hogy a *tra-1* funkcióvesztéses egyszeres mutánsok önmagukban is jelentős embrionális letalitást mutatnak (3. táblázat). Ez az életképtelenség additívnek bizonyult a *tra-1(-); sex-1(-)* kettős mutáns állatokban (X táblázat). Ez arra utal, hogy a *tra-1* és *sex-1* gének párhuzamosan hatnak a *xol-1* aktivitására. A *tra-1* funkciónyerés hatását *fem-3* (a *tra-1* upstream inhibitora) funkcióvesztéses, illetve *tra-1* funkciónyeréses mutánsok segítségével vizsgáltam. Mindkét esetben jelentősen szuppresszáldott a *sex-1(-)* mutációk által okozott embrionális életképtelenség (3. táblázat). Ez magyarázható azzal, hogy a *tra-1* gátolja *xol-1*-et, tehát a hiperaktív *tra-1* csökkenti a *sex-1* mutánsokban megnyilvánuló hiperaktív *xol-1* dóziskompensációra gyakorolt hatásának mértékét. *sex-1* mutáns XX embriókban tehát mérséklődött a X-géntermékek túlzott dózisa hiperaktív *tra-1* következtében.

Elvégeztem egy dóziskompensációban résztvevő faktor vizsgálatát is. A *dpy-21* gén a DCC egyik komponensét kódolja (Yonker és Meyer, 2003). *dpy-21(-)* mutáns állatokban a

nem megfelelő X-kapcsolt géndózis jelentős XX-specifikus életképtelenséget eredményez. Eredményeim alapján a *tra-1(-)* mutációk tovább fokozták a *dpy-21(-)* mutáns embriók pusztulását. A *tra-1* funkcióvesztés tehát a *xol-1* gén aktivitásának fokozásán keresztül növelte az érzékenyített genetikai háttér (*dpy-21* mutáns) embrionális életképtelenségének penetranciáját (3. táblázat).

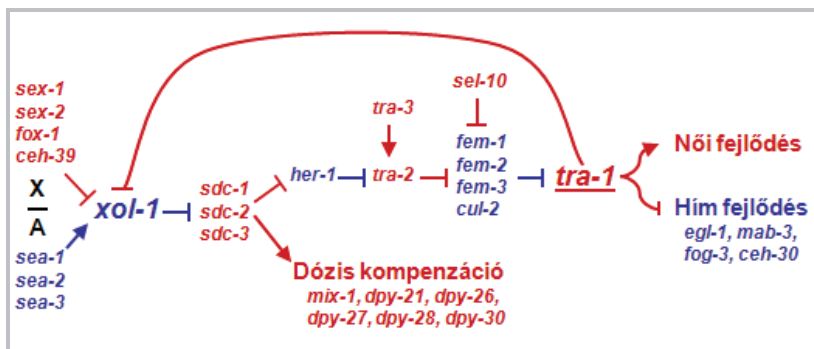
A továbbiakban azt a kérdést tisztáztam, hogy a *tra-1(-)* mutánsok embrionális életképtelensége az ektopikus *xol-1* aktiváció következménye-e? A *xol-1* csendesítése önmagában nem vezetett XO-specifikus pusztuláshoz (feltehetően az RNSi kezelés hipomorf hatása miatt), *sex-1(-)* és *tra-1(-)* mutánsokban viszont szignifikánsan szuppresszálta a XX-specifikus életképtelenségét (4. táblázat). Hasonló hatást sikerült kimutatni a *xol-1* gént aktiváló autoszómás faktor, a *sea-2* gén RNSi-vel történő inaktiválása során is (5. táblázat).

A *tra-1* funkcióvesztés feltehetően az XX kariotípusú állatokban okoz embrionális életképtelenséget. Ennek igazolását *him-8(e1489)* mutánsokban mutattam ki. *him-8(e1489)* mutáns hermafrodita állatok meiózisa során ugyanis gyakori a kromoszóma szét-nem-válás (*non-disjunction*), amelynek eredményeként az utódok 35,7%-a hím (XO kariotípusú) állatá fejlődik (emlékeztetőül: a vad típusú populációkban a hímek aránya csak 0.03%). A *him-8(e1489)* törzsben tapasztalható hím arány jelentősen megnövekedett *tra-1* dsRNS kezelés hatására, ami arra utal, hogy az embrionális életképtelenség elsősorban az XX kariotípusú embriókat érinti. Közvetett bizonyítékként *tra-1(RNSi)* hermafroditákat és X kromoszómára integrálódott GFP riportert konstrukciót hordozó hímeket kereszteztem (*bIs1* - Grant és Hirsh, 1999). A fejlődésben megrekedt F1 embriókban a transzgén jelenlétét PCR-rel teszteltem, és ezek 80 %-ában azonosítottam a transzgénikus apától örökölt *gfp* gén jelenlétét. A *tra-1* RNSi okozta életképtelenség tehát az XX embriókat érintette. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a TRA-1 fehérje aktiválja a dózikompenzációs komplexet. Ennek a kölcsönhatásnak a fontossága az alábbi fejezetben kerül tárgyalásra.

7.1.3. A *xol-1* és *tra-1* gének közötti genetikai kapcsolat következményei

Vizsgálataim során kimutattam, hogy a szex-determinációs és dóziskompenzációs génkaszkádot szabályozó X kromoszómás *xol-1* gén autoszómális gátlás alatt is áll. Ez a gátlás a szex-determinációs génkaszkád terminális transzkripcióis faktorán, a TRA-1A fehérjén keresztül fejeződik ki (32. ábra).

Eredményeim szerint a TRA-1A transzkripcionálisan gátolja a *xol-1* gént. Ismert, hogy számos további fehérje szabályozza a *xol-1* kifejeződését: egyes autoszómális gének terméke (pl. SEA-1 és SEA-2) aktiváló, míg az X kromoszómáról érkező jelek (pl. SEX-1, SEX-2, FOX-1, CEH-39) gátló hatásúak (Meyer, 2005). A *xol-1* gén aktivitása tehát az X kromoszómás gátló és az autoszómákról érkező aktiváló jelek mennyiségi viszonyától függően alakul ki. Ha a női fejlődést jelentő magas X:A arány (1,0) meggátolja a *xol-1* kifejeződését, akkor beindul a dóziskompensáció mechanizmusa, amely viszont megfelezi mindkét X kromoszóma géndózisát. Feltételezhető azonban, hogy ekkor az X kromoszómáról származó „numerátor” gének dózisa is lecsökken, így a *xol-1* újra aktiválódik (a felezett „numerátor” géndózis nem képes felülmúri az autoszómákról érkező „denominátor” aktiváló jeleket) és ezáltal a dóziskompensáció megszűnik. Ezért szükség lehet egy olyan mechanizmusra, amely képes fenntartani a *xol-1* gén gátlását a dóziskompensáció aktiválódása után. Más szavakkal a kromoszómaszámláló mechanizmus átvált génszabályozó mechanizmusra. Másrészt az egyedfejlődés során biztosítani kell azt is, hogy az egyed összes sejtje azonos nemű legyen. Ezáltal fixálódhat végleg a sejtek neme. Harmadrészt kell lennie egy X kromoszómától független mechanizmusnak, amely képes szétkapcsolni a kariotípus és a szomatikus szex közötti szabályozási kapcsolatot. Csak ezen



32. ábra. A *C. elegans* szex-determinációs és dóziskompensációs génkaszkád kiterjesztett modellje. A terminális *tra-1* gén (aláhúzva) egy visszacsatolási mechanizmuson keresztül gátolja a kaszkád *upstream* részén elhelyezkedő *xol-1* genetikai kapcsoló expresszióját. Az ábrán piros színnel jelöltem a női (hermafrodita) fejlődést elősegítő géneket, kékkel a hím fejlődést elősegítő faktorokat. A nyilak aktiváló, a talpas nyilak gátló kölcsönhatásra utalnak. A feltárt visszacsatolási mechanizmus révén hat a szex-determinációs génkaszkád a dóziskompensációra.

utóbbival magyarázható az, hogy az XX kariotípusú (normálisan hermafrodita) állatok *tra-1* génaktivitás hiányában hím szómát differenciálnak. A doktori munkám során feltárt visszacsatolási (*feedback*) mechanizmus (a *tra-1* represszálja a *xol-1* aktivitását; 32. ábra) funkciója tehát feltehetően i, a szomatikus ivari fejlődés uniformitásának biztosítása, ii, a dóziskompensáció stabil fenntartása és iii, a szomatikus szex génszintű meghatározása az egyedfejlődés egy bizonyos pontjától. Eredményeim elsőként tártak fel egy autoszómás gént, a *tra-1*-et, amely a *xol-1* aktivitását gátolja és így a dóziskompensációt aktiválja. Érdemes újra kihangsúlyozni: az autoszómás *tra-1* gén a dóziskompensáció aktiválásával (amely az X kromoszáon lokalizált gének aktivitását felezi) fenntartja saját aktivitását, így a *xol-1* gátlása és a dóziskompensáció aktivitása stabil marad. A TRA-1A tehát visszacsatol az útvonal *upstream* részére, megakadályozva ezzel a jelátvitel random fluktuációinak kedvezőtlen hatását az állat fejlődésének későbbi szakaszaiban.

7.1.4. A *tra-1* és *lin-39* gének közötti kapcsolat molekuláris vizsgálata

Az *in silico* analízis során kimutattam, hogy egy potenciális TRA-1A kötőhely található a *lin-39* gén promóterében (23. ábra). A LIN-39 fehérje a *C. elegans* vulva fejlődés központi szabályozó faktora. A hermafrodita fonálféreg vulvaszövetének fejlődése jelenleg a fejlődésbiológia egyik legintenzívebben vizsgált és legjobban megismert szervfejlődési modellje (Pirez-da Silva és Sommer, 2003). A vulva fejlődése hat darab vulva prekursorsejt (VPC) egy csoportjából indul ki a test középső részének ventrális régiójában a lárvális fejlődés L3 stádiuma során (Sternberg, 2005). Azok a VPC-k, melyek elsődleges vagy másodlagos vulva sejsorsot differenciálnak, többször osztódnak és leszármazottaik alakítják ki a kifejlett vulvaszövetet, míg azok a VPC-k, amelyek harmadlagos vulva sejsorsot differenciálnak, csak egyszer osztódnak, azután fuzionálnak a hipodermális szincíciummal. A felnőtt hermafrodita vulvájának kialakulása 4 különböző jelátviteli útvonal összehangolt működésének eredménye: ezek a Ras/RTK/MAPK, Wnt, Notch és a synMuv útvonalak. Egyre több kísérletes bizonyíték látszik igazolni azt a feltevést, hogy ezek a vulva sejsorsokat szabályozó genetikai útvonalak hatásai a *lin-39/Hox* gén promóterén integrálódnak.

A *lin-39* gén promóterében található potenciális TRA-1A kötőhely funkcionális voltát *in vitro* termelt fehérje–DNS kötési teszttel (EMSA) igazoltam (24. ábra). A *lin-39* szabályozó régióban található kötőhelyet tartalmazó oligonukleotidokat használva DNS–fehérje komplex képződését detektáltam. Abban az esetben viszont, amikor a *lin-39*

oligonukleotid prediktált TRA-1A kötőhelyét néhány konzervált pozíciójában megváltoztattam (mutáns oligonukleotid), nem képződött komplex. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a TRA-1A transzkripció faktor szekvencia-specifikusan kötődik a *lin-39/Hox* promóterhez *in vitro*.

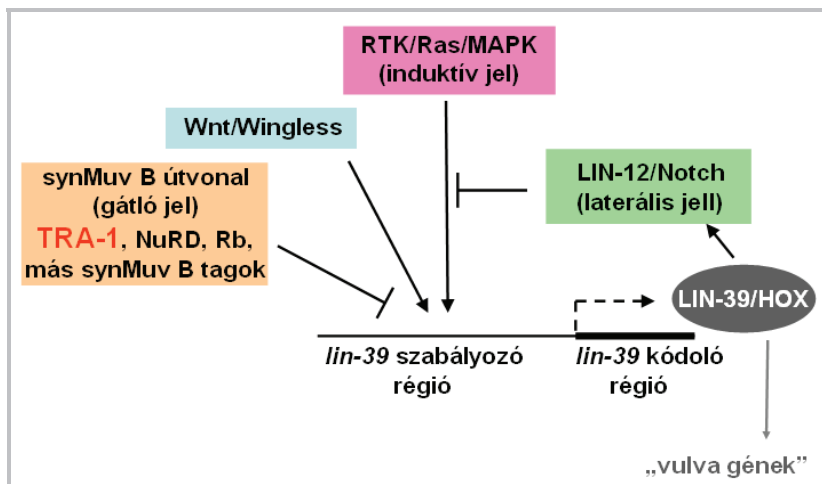
Az XX kariotípusú állatokban a *tra-1* funkció teljes hiánya a szómát hím típusúvá transzformálja: ezek az állatok hím párzószervvel és gonáddal rendelkeznek (Zarkower, 2006). *tra-1(e1488)* hipomorf mutáns állatok interszex fenotípusúak. Ezekben a gonád és az intesztinális sejtjek női, míg a test többi része (farki párzószerv, izomzat és idegrendszer) hím jellegzetességeket mutatnak. A *tra-1(e1488)* mutáns hermafrodita állatok mintegy 37%-ában fejlődik ki vulvaszövet (Szabó Emese doktori tézise, 2010). Ezek az állatok azonban jellegzetes vulvafejlődési defektust mutatnak: a vulva-sejtsorok abnormális mintázatának következtében a kifejlett vulva kitüremkedik a test ventrális síkjából (Pvl fenotípus). Eredményeim azt mutatják, hogy a *tra-1* szerepet játszik a vulva fejlődés szabályozásában. Mivel a két *tra-1* transzkriptum (*tra-1a* és *tra-1b*) együttes inaktíválása erősebben befolyásolta a vulva mintázatképződését, mindkét *tra-1* izoformának szerepe lehet a vulva fejlődése során. A *fem-3* gén (a *tra-1* upstream represszora) inaktíválása szintén befolyásolja a vulva mintázatképződését. Ez azt sugallja, hogy a szex-determinációs génkaskád szabályozza a vulva mintázatképződését. Ezek az eredményeink a vulva kifejlődését szabályozó új genetikai útvonalat határoznak meg (eredmények ismeretében a „felfedezés” nem is tűnik meglepőnek; a vulva a hermafrodita *C. elegans* tipikus szex-specifikus szerve).

Egy funkcionális *gfp::tra-1* riporter expresszióját vizsgálva kimutattam, hogy a fehérje jelen van a VPC-kben a vulvafejlődés indukciója előtt és az indukció ideje alatt is (25. ábra). A riporter szintén megfigyelhető volt a VPC-k osztódásával létrejövő utódsejtekben, valamint a vulva felépítésében részt nem vevő, de a vulvafejlődés szabályozásában fontos szerepet játszó sejtekben (pl. a hipodermisben) is.

A hermafrodita fonálféregben a *lin-39/Hox* gén egyik funkciója a vulva szövet fejlődésének szabályozása: a *lin-39* aktivitás hiánya a vulva kifejlődés elmaradását (*Vulvaless* fenotípus), hiperaktivitása ektopikus vulva indukciót (*Multivulva* fenotípus) eredményez (Eizinger és Sommer, 1997, Takács-Vellai és mtsi., 2007). Megfigyeltem, hogy a *tra-1* inaktíválása a VPC-k rendellenes mintázatképződését váltja ki azáltal, hogy gátolja a VPC-k és a hipodermális szincícium fúzióját (27. ábra). A *tra-1* gén inaktíválása továbbá *alae*-defektusokat, illetve a *seam* sejtek rendellenes sejtfúzióját eredményezte. Ez utóbbi folyamatról ismert, hogy a *lin-39* gén szabályozása alatt áll (28. ábra; Shemer és mtsi., 2004).

7.1.5. A *tra-1* egy *synMuv B* gén

A hipodermiszből érkező synMuv jelek gátolják a vulvasejtek indukcióját (Cui és mtsi., 2006). Az út synMuv útvonalak egyes komponensei közvetlenül szabályozzák a *lin-39* gén expresszióját a VPC-kben (Guerry és mtsi., 2007; Maloof és Kenyon, 1998; von Zelewsky és mtsi., 2000). Ismert az is, hogy a *synMuv B* osztályba tartozó gének szerepet játszanak a hermafrodita fejlődésben (Grote és Conradt, 2006), ezért felmerült az a kérdés, vajon a TRA-1 kölcsönhat-e a synMuv útvonalakkal a vulvafejlődés szabályozásában? Kimutattam, hogy a *tra-1* inaktíválása fokozott vulvaindukcióhoz vezet *synMuv AB* kettős mutáns állatokban és *Multivulva* fenotípust okoz *synMuv A* mutáns háttérben (6., 7. és 8. táblázatok). Ezek alapján elmondható, hogy a *tra-1* egy *synMuv B* gén, melynek tagjai között számos kromatin szabályozó faktor található. A TRA-4 fehérje a TRA-1A kölcsönható partnere és szintén synMuv B faktorként azonosították (Grote és Conradt, 2006). A két fehérje számos kölcsönható partnere is ismert, ilyenek többek között a hiszon deacetiláz HDA-1 vagy a hiszon *chaperone* NASP-1, valamint több más synMuv B fehérje (Grote és Conradt, 2006).



33. ábra. A vulvafejlődést szabályozó jelátviteli útvonalak kapcsolata. A TRA-1A fehérje gátolja a *lin-39* gén expresszióját. A *lin-39* transzkripció szabályozásán keresztül a szex-determinációs géncaskád kommunikál a vulva kifejlődésben szerepet játszó más jelátviteli útvonalakkal. A nyílak aktiválást, a talpas nyílak gátlást jelölnek.

Ezek a faktorok egymással kölcsönhatva szintén szex-determinációs funkcióval (feminizáló hatással) bírnak, de semmit sem tudunk arról, hogyan működnek együtt a *tra-1*-gyel a hím gének gátlása során és milyen mechanizmuson keresztül fejtik ki a hatásukat.

Mint fentebb láttuk, a *tra-1* egy *synMuv B* gén. A *synMuv B* géncsoport több tagja is kromatin módosító tulajdonsággal rendelkező fehérjéket (pl. a NuRD és DRM komplexek tagjai) kódol (Harrison, 2006). Ismert, hogy a dóziskompensáció emlősökben és rovarokban végső soron kromatin szinten szabályozódik. Eredményeim, miszerint a kromatin faktorokhoz hasonló hatással bíró (*synMuv B* gén) *tra-1* gátolja a *xol-1* expresszióját és ezáltal aktiválja a dóziskompensációs mechanizmust, a nematodákban is felveti a dóziskompensáció kromatin szintű szabályozásának lehetőségét. Ez elvezethet ahhoz a provokatív állításhoz, hogy a dóziskompensáció a különböző állati taxonokban – a megfigyelhető szabályozó molekuláris mechanizmusok divergenciája ellenére – evolúciósan konzervált módon fejlődött ki.

A TRA-1A, amely a hím fejlődéshez szükséges differenciációs gének transzkripció represszora, gátolja a *xol-1* gént. Ezáltal a dóziskompensációt is szabályozza (aktiválja), vagyis módosítani képes az ivari kromoszómák transzkripció állapotát közvetlen DNS-kötő funkció nélkül is. Ilyen X-kormoszómát csendesítő tulajdonságot eddig a MES-2,-3 és -6 fehérjék esetében írtak le *C. elegans*-ban (Bender és mtsi., 2004). A MES fehérjék a fonálféreg Polycomb represszor komplexének tagjaiként a csírvonal sejtjeinek X kromoszómáit tartják represszált állapotban a hiszton 3 27-es lizin trimetilációjával (H3K27m3). Figyelembe véve a a humán és *Drosophila* dóziskompensáció folyamatok kromatin szintű szabályozását, érdekes lehetőséget jelent, hogy az alapvetően különböző módon evolválódott szex-determinációs és dóziskompensációs mechanizmusoknak lehet közös jellegzetességük, mégpedig a kromatin szabályozás szintjén.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A fonalféreg *Caenorhabditis elegans*-t speciális ivari dimorfizmus jellemzi: a vad típusú populációkat önmegtermékenyítő hermafroditák, valamint hím egyedek alkotják. Az állat egyedfejlődése során az ivar-specifikus jellegzetességek kialakulását a szex-determinációs génkaszkád szabályozza. Ez a komplex genetikai útvonal olyan konzervált és alapvető fontosságú biológiai folyamatokra hat, mint pl. az apoptózis, illetve az idegrendszer, a csíravonal és a párzószervek fejlődése. A *C. elegans* szex-determinációs génkaszkád terminális eleme egy transzkripciós faktort kódol; ez a TRA-1 fehérje, amely közvetlenül szabályozza a két nem közötti összes anatómiai eltérés kialakulását.

A *tra-1* gén evolúciósan konzervált. Ortológjai megtalálhatók az ecetmuslica (*Ci: Cubitus interruptus* gén) és az ember (*Gli: Glioblasztóma-asszociált onkogének*) genomjában egyaránt. Drosophilában és emlősökben ezek a gének a Hedgehog (Hh) jelátviteli útvonal terminális transzkripciós faktorait kódolják. A Hh jelátvitel az állati egyedfejlődés egyik fő szabályozó rendszere, amelynek hibás működése számos fejlődési rendellenesség és rákos elváltozás kialakulásával hozható összefüggésbe.

Dolgozatomban a *tra-1* által közvetlenül szabályozott (cél)génnek meghatározásával foglalkozom. A TRA-1A fehérje potenciális kötőhelyének genom-szintű meghatározásával új potenciális célgéneket azonosítok és jellemzek. A *C. elegans* genomban található potenciális TRA-1A célpontok azonosítása után három gén esetében (*lin-39*, *xol-1* és *goa-1*) *in vitro* kísérletek alkalmazásával igazolom a transzkripciós faktor szekvencia-specifikus nukleinsav-kötő képességét, valamint két gén esetében (*lin-39* és *xol-1*) *in vivo* módszerekkel is kimutatom a szabályozó kölcsönhatást. Ezek a célgének más jelátviteli útvonalak ismert komponensei, eredményeim tehát közelebb vihetnek a *C. elegans*-ban működő genetikai útvonalak között ható bonyolult kölcsönhatások (*signalling crosstalk*) jobb megértéséhez.

A tézisben kimutatom továbbá, hogy a szex-detereminációs útvonal dóziskompenzációs hatással is bír, mivel a TRA-1A egy visszacsatolási (*feedback*) mechanizmuson keresztül stabilizálja az X kromoszómán található gének dózisát. Igazolom továbbá, hogy a *lin-39 Hox* gén transzkripciós gátlásán keresztül a szex-determinációs génkaszkád közvetlenül szabályozza a hermafrodita állatok párzószerveinek kialakulását, amely az állat tipikus ivar-specifikus szerve. Ezzel a *C. elegans* vulvaszövet kifejlődését szabályozó új genetikai útvonalat tártam fel.

9. SUMMARY

In *Drosophila* and humans, members of the Glioblastoma-associated (GLI) protein family act as the terminal transcription factors of the Hedgehog (Hh) signaling pathway that controls several key developmental processes. The genome of the nematode *Caenorhabditis elegans* encodes a single GLI ortholog, TRA-1A, which is the terminal regulator of the nematode sex-determination gene cascade. Here, I have performed a genetic analysis of *tra-1*. By comparing the proposed binding sites of TRA-1A targets identified previously, I have determined a consensus binding site for TRA-1A. Then, I have searched the *C. elegans* genome for such putative consensus sites, and identified 21 novel conserved TRA-1A binding sites located within upstream regulatory or intronic sequences. I have analyzed some of these novel TRA-1A targets in details, and found the followings.

Signaling via *tra-1* is a novel pathway that specifies cell fates during *C. elegans* vulval development. The transcription factor TRA-1A binds to the regulatory region of the *Hox* gene *lin-39*, a central regulator of vulval development, and regulates its expression in the vulval precursor cells (VPCs) prior to and during vulval induction. Furthermore, *tra-1* interacts with the class B *synMuv* genes, many of which are known to be involved in chromatin-mediated transcriptional repression of cell proliferation, to specify vulval fates. *tra-1* also influences the fusion pattern of VPCs with the hypodermis and the fusion of seam cells with each other. The regulation of cell fusion is a newly identified function for GLI-like proteins.

A conserved TRA-1A binding site is located within the promoter of *xol-1* too. *xol-1* is known to be the master switch gene controlling sex-determination and dosage compensation: it is normally expressed in males (XO), where it promotes male development and prevents dosage compensation. TRA-1A binds to the consensus site in the *xol-1* promoter *in vitro* and inhibits the expression of *xol-1* in XX animals *in vivo*. Furthermore, inactivation of *tra-1* enhances, whereas hyperactivation of *tra-1* suppresses, lethality in animals with elevated *xol-1* activity. Thus, *tra-1* is the first identified autosomal gene that inhibits *xol-1*. By repressing *xol-1* in XX animals, *tra-1* contributes to the maintenance of X-chromosome repression during dosage compensation. These data imply the existence of a regulatory feedback loop within the *C. elegans* sex-determination and dosage compensation gene cascade that ensures the accurate dose of X-linked genes in cells destined to adopt hermaphrodite fate.

In humans, dysregulation of Hh signaling has been implicated in cancer, skeletal malformation and defective neuronal patterning. Our results presented here may help to better understand how compromised GLI activity leads to the development of such diseases.

10. FELHASZNÁLT IRODALOM

- Afshar K, Willard FS, Colombo K, Johnston CA, McCudden CR, Siderovski DP, Gonczy P.** RIC-8 is required for GPR-1/2-dependent $G\alpha$ function during asymmetric division of *C. elegans* embryos. *Cell*. 2004 Oct 15;119(2):219-30.
- Alcedo J, Ayzenzon M, Von Ohlen T, Noll M, Hooper JE.** The *Drosophila* *smoothed* gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell* . 1996 Jul 26;86(2):221-32.
- Alper S, Kenyon C.** The zinc finger protein REF-2 functions with the *Hox* genes to inhibit cell fusion in the ventral epidermis of *C. elegans*. *Development* . 2002 Jul;129(14):3335-48.
- Alper S, Podbilewicz B.** Cell fusion in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Mol. Biol.* . 2008;475:53-74. Review.
- Altman DG.** *Practical Statistics for Medical Research*. Chapman and Hall. 1991.
- Ballabio A, Willard HF.** Mammalian X-chromosome inactivation and the *XIST* gene. *Curr Opin Genet Dev*. 1992 Jun;2(3):439-47. Review.
- Barbash DA, Cline TW.** Genetic and molecular analysis of the autosomal component of the primary sex determination signal of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 1995 Dec;141(4):1451-71.
- Bashaw GJ, Baker BS.** The regulation of the *Drosophila* *msl-2* gene reveals a function for *Sex-lethal* in translational control. *Cell*. 1997 May 30;89(5):789-98.
- Bender LB, Cao R, Zhang Y, Strome S.** The MES-2/MES-3/MES-6 complex and regulation of histone H3 methylation in *C. elegans*. *Curr Biol*. 2004 Sep 21;14(18):1639-43.
- Bergmann DC, Lee M, Robertson B, Tsou MF, Rose LS, Wood WB.** Embryonic handedness choice in *C. elegans* involves the $G\alpha$ protein GPA-16. *Development* 2003. 130, 5731–5740.
- Berset T, Hoier EF, Battu G, Canevascini S, Hajnal A.** Notch inhibition of RAS signaling through MAP kinase phosphatase LIP-1 during *C. elegans* vulval development. *Science*. 2001 Feb 9;291(5506):1055-8.
- Bopp D, Bell LR, Cline TW, Schedl P.** Developmental distribution of female-specific Sex-lethal proteins in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev*. 1991 Mar;5(3):403-15.
- Brenner S.** The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1974 May;77(1):71-94.
- Brown JB.** Oestrogens in the human female *Mod Trends Hum Reprod Physiol*. 1963;15:49-

- Brown CJ, Lafreniere RG, Powers VE, Sebastio G, Ballabio A, Pettigrew AL, Ledbetter DH, Levy E, Craig IW, Willard HF.** Localization of the X inactivation centre on the human X chromosome in Xq13. *Nature*. 1991 Jan 3;349(6304):82-4.
- Burdine RD, Branda CS, Stern MJ.** EGL-17(FGF) expression coordinates the attraction of the migrating sex myoblasts with vulval induction in *C. elegans*. *Development*. 1998 Mar;125(6):1083-93.
- Burtis KC, Baker BS.** *Drosophila doublesex* gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. *Cell*. 1989 Mar 24;56(6):997-1010.
- Bürglin TR, Kuwabara PE.** Homologs of the Hh signalling network in *C. elegans*. *WormBook*. 2006 Jan 28;1-14. Review.
- Carmi I, Kopczynski JB, Meyer BJ.** The nuclear hormone receptor SEX-1 is an X-chromosome signal that determines nematode sex. *Nature*. 1998 Nov 12;396(6707):168-73.
- Carrel, L. & Willard, H. F.** (2005) X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* **434**, 400–404.
- Ceol CJ, Horvitz HR.** *dpl-1* DP and *egl-1 E2F* act with *lin-35 Rb* to antagonize Ras signaling in *C. elegans* vulval development. *Mol Cell*. 2001 Mar;7(3):461-73.
- Ceol CJ, Horvitz HR.** A new class of *C. elegans synMuv* genes implicates a Tip60/NuA4-like HAT complex as a negative regulator of Ras signaling. *Dev Cell*. 2004 Apr;6(4):563-76.
- Chadwick D, Goode J.** The Genetics and Biology of Sex Determination: *Novartis Foundation Symposium 244*. 2002; Volume 244
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC** Green fluorescent protein as a marker for gene expression.. *Science*. 1994 Feb 11;263(5148):802-5.
- Chen P, Ellis RE.** TRA-1A regulates transcription of *fog-3*, which controls germ cell fate in *C. elegans*. *Development*. 2000 Jul;127(14):3119-29.
- Chen EH, Grote E, Mohler W, Vignery A.** Cell-cell fusion. *FEBS Lett*. 2007 May 22;581(11):2181-93. Review.
- Chen EH, Olson EN** Towards a molecular pathway for myoblast fusion in *Drosophila*.. *Trends Cell Biol*. 2004 Aug;14(8):452-60. Review.
- Chernomordik LV, Kozlov MM** Mechanics of membrane fusion.. *Nat Struct Mol Biol*. 2008 Jul;15(7):675-83. Review.

- Chin-Sang ID, Spence AM.** *Caenorhabditis elegans* sex-determining protein FEM-2 is a protein phosphatase that promotes male development and interacts directly with FEM-3. *Genes Dev.* 1996 Sep 15;10(18):2314-25.
- Chow J, Heard E.** X inactivation and the complexities of silencing a sex chromosome. *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Jun;21(3):359-66. Epub 2009 May 26. Review.
- Christiansen AE, Keisman EL, Ahmad SM, Baker BS.** Sex comes in from the cold: the integration of sex and pattern. *Trends Genet.* 2002 Oct;18(10):510-6. Review.
- Chuang, P.-T., Lieb, J. D. and Meyer, B. J.** (1996). Sex-specific assembly of a dosage compensation complex on the nematode X chromosome. *Science* **274**, 1736–1739.
- Clark SG, Chisholm AD, Horvitz HR.** Control of cell fates in the central body region of *C. elegans* by the homeobox gene *lin-39*. *Cell.* 1993 Jul 16;74(1):43-55.
- Cline TW.** The *Drosophila* sex determination signal: how do flies count to two? *Trends Genet.* 1993 Nov;9(11):385-90. Review.
- Colombo K, Grill SW, Kimple RJ, Willard FS, Siderovski DP, Gonczy P.** Translation of polarity cues into asymmetric spindle positioning in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Science.* 2003. 300, 1957–1961.
- Conradt B, Horvitz RH.** (1999). The TRA-1A sex determination protein of *C. elegans* regulates sexually dimorphic cell deaths by repressing the *egl-1* cell death activator gene. *Cell* **98**, 317–327.
- Couwenbergs C, Spilker AC, Gotta M.** Control of embryonic spindle positioning and *Ga* activity by *C. elegans* RIC-8. *Curr. Biol.* 2004. 14, 1871–1876.
- Cronmiller C, Schedl P, Cline TW.** Molecular characterization of *daughterless*, a *Drosophila* sex determination gene with multiple roles in development. *Genes Dev.* 1988 Dec;2(12A):1666-76.
- Cuppen E, van der Linden AM, Jansen G, Plasterk RH.** Proteins interacting with *Caenorhabditis elegans* *Ga* subunits. *Comparative and Functional Genomics.* 2003. 4, 479–491.
- Csankovszki G, McDonel P, Meyer BJ.** (2004). Recruitment and spreading of the *C. elegans* dosage compensation complex along X chromosomes. *Science* **303**, 1182–1185.
- Cui M, Chen J, Myers TR, Hwang BJ, Sternberg PW, Greenwald I, Han M.** *SynMuv* genes redundantly inhibit *lin-3/EGF* expression to prevent inappropriate vulval induction in *C. elegans*. *Dev Cell.* 2006 May;10(5):667-72.
- Dawes HE, Berlin DS, Lapidus DM, Nusbaum C, Davis TL Meyer BJ.** Dosage

- compensation proteins targeted to X chromosomes by a determinant of hermaphrodite fate. *Science*. 1999 Jun 11;284(5421):1800-4.
- Deshpande G, Stuke J, Schedl P.** scute (sis-b) function in *Drosophila* sex determination. *Mol Cell Biol*. 1995 Aug;15(8):4430-40.
- Driscoll M.** Molecular genetics of cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Neurobiol*. 1992 Nov;23(9):1327-51. Review.
- Duffy JB, Gergen JP.** The *Drosophila* segmentation gene *runt* acts as a position-specific numerator element necessary for the uniform expression of the sex-determining gene *Sex-lethal*. *Genes Dev*. 1991 Dec;5(12A):2176-87.
- Earp LJ, Delos SE, Park HE, White JM** The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;285:25-66. Review.
- Eizinger A, Sommer RJ.** The homeotic gene *lin-39* and the evolution of nematode epidermal cell fates. *Science*. 1997 Oct 17;278(5337):452-5.
- Erickson JW, Cline TW.** A bZIP protein, sisterless-a, collaborates with bHLH transcription factors early in *Drosophila* development to determine sex. *Genes Dev*. 1993 Sep;7(9):1688-702.
- Evangelista M, Tian H, de Sauvage FJ.** The hedgehog signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Oct 15;12(20 Pt 1):5924-8. Review.
- Fay DS, Yochem J.** The *SynMuv* genes of *Caenorhabditis elegans* in vulval development and beyond. *Dev Biol*. 2007 Jun 1;306(1):1-9.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):806-11.
- Ford JR, Schumacher JM.** Chromosome dynamics: the case of the missing condensin. *Curr Biol*. 2009 Feb 10;19(3):R127-9. Review.
- Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer J.** Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature*. 2000. 408, 325–330.
- Gems D, Riddle DL.** Genetic, behavioral and environmental determinants of male longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 2000 Apr;154(4):1597-610.
- Gladden JM, Meyer BJ.** A ONECUT homeodomain protein communicates X chromosome dose to specify *Caenorhabditis elegans* sexual fate by repressing a sex switch gene. *Genetics*. 2007 Nov;177(3):1621-37.
- Gleason JE, Korswagen HC, Eisenmann DM.** Activation of Wnt signaling bypasses the

- requirement for RTK/Ras signaling during *C. elegans* vulval induction. *Genes Dev.* 2002. 16: 1281-1290.
- Glise B, Miller CA, Crozatier M, Halbisen MA, Wise S, Olson DJ, Vincent A, Blair SS.** Shifted, the *Drosophila* ortholog of Wnt inhibitory factor-1, controls the distribution and movement of Hedgehog. *Dev Cell.* 2005 Feb;8(2):255-66.
- Gotta M, Ahringer J.** Distinct roles for $G\alpha$ and $G\beta\gamma$ in regulating spindle position and orientation in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Nat. Cell Biol.* 2001. 3, 297–300.
- Gotta M, Dong Y, Peterson YK, Lanier SM, Ahringer J.** Asymmetrically distributed *C. elegans* homologs of AGS3/PINS control spindle position in the early embryo. *Curr. Biol.* 2003. 13, 1029–1037.
- Grant B, Hirsh D.** Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte. *Mol Biol Cell.* 1999 Dec;10(12):4311-26.
- Graves LE, Segal S, Goodwin EB.** TRA-1 regulates the cellular distribution of the *tra-2* mRNA in *C. elegans*. *Nature.* 1999 Jun 24;399(6738):802-5.
- Greenwald I, Sternberg PW, Horvitz HR.** The *lin-12* locus specifies cell fates in *Caenorhabditis elegans*. *Cell.* 1983. 34: 435–444.
- Grote P, Conradt B.** The PLZF-like protein TRA-4 cooperates with the Gli-like transcription factor TRA-1 to promote female development in *C. elegans*. *Dev. Cell.* 2006 11, 561–573.
- Guerry F, Marti CO, Zhang Y, Moroni PS, Jaquiéry E, Müller F.** The Mi-2 nucleosome-remodeling protein LET-418 is targeted via LIN-1/ETS to the promoter of *lin-39/Hox* during vulval development in *C. elegans*. *Dev Biol.* 2007 Jun 15;306(2):469-79.
- Hargitai B, Kutnyánszky V, Blauwkamp TA, Steták A, Csankovszki G, Takács-Vellai K, Vellai T.** *xol-1*, the master sex-switch gene in *C. elegans*, is a transcriptional target of the terminal sex-determining factor TRA-1. *Development.* 2009 Dec;136(23):3881-7.
- Harrison MM, Ceol CJ, Lu X, Horvitz RH.** Some *C. elegans* class B synthetic multivulva proteins encode a conserved LIN-35 Rb-containing complex distinct from a NuRD-like complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006. 103: 16782-16787.
- Harrison SC.** Viral membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol.* 2008 Jul;15(7):690-8. Review.
- Heard, E.** (2005). Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 482–489
- Hedgecock EM, White JG.** Polyploid tissues in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.* 1985 Jan;107(1):128-33.
- Herman, M. A.** Hermaphrodite cell-fate specification, *WormBook.* 2006 Jan 09

- Hess HA, Roper JC, Grill SW, Koelle MR.** RGS-7 completes a receptor-independent heterotrimeric G protein cycle to asymmetrically regulate mitotic spindle positioning in *C. elegans*. *Cell*. 2004; 119, 209–218.
- Hickey PC, Jacobson D, Read ND, Louise Glass NL.** Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol*. 2002 Oct;37(1):109-19.
- Hodgkin J.** Sex determination in the nematode *C. elegans*: analysis of *tra-3* suppressors and characterization of fem genes. *Genetics*. 1986 Sep;114(1):15-52.
- Hodgkin J.** A genetic analysis of the sex-determining gene, *tra-1*, in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev*. 1987 Sep;1(7):731-45.
- Hodgkin J.** Primary sex determination in the nematode *C. elegans*. *Development*. 1987;101 Suppl:5-16.
- Hodgkin J.** Molecular cloning and duplication of the nematode sex-determining gene *tra-1*. *Genetics*. 1993 Mar;133(3):543-60.
- Hooper JE, Scott MP.** Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Apr;6(4):306-17.
- Hoshijima K, Inoue K, Higuchi I, Sakamoto H, Shimura Y.** Control of *doublesex* alternative splicing by transformer and transformer-2 in *Drosophila*. *Science*. 1991 May 10;252(5007):833-6.
- Ingham PW, McMahon AP.** Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*. 2001 Dec 1;15(23):3059-87. Review
- Jacobs PA, Strong JA.** A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature*. 1959 Jan 31;183(4657):302-3.
- Jansen G, Thijssen KL, Werner P, van der Horst M, Hazendonk E, Plasterk R.H.** The complete family of genes encoding G proteins of *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Genet*. 1999. 21, 414–419.
- Jiang J, Hui CC.** Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev Cell*. 2008 Dec;15(6):801-12. Review.
- Kamath R, Fraser AG, Ahringer J, Plasterk RH.** Genome-Wide RNAi of *C. elegans* Using the Hypersensitive *rrf-3* Strain Reveals Novel Gene Functions. *PLoS Biol*. 2003. 1, E12
- Kasper M, Regl G, Frischauf AM, Aberger F.** GLI transcription factors: mediators of oncogenic Hedgehog signalling. *Eur J Cancer*. 2006 Mar;42(4):437-45.
- Kelley RL, Wang J, Bell L, Kuroda MI.** *Sex lethal* controls dosage compensation in *Drosophila* by a non-splicing mechanism. *Nature*. 1997 May 8;387(6629):195-9.

- Kimble J, Crittenden SL.** Germline proliferation and its control. *WormBook*. 2005 Aug 15:1-14. Review.
- Koelle MR, Horvitz HR.** EGL-10 regulates G protein signaling in the *C. elegans* nervous system and shares a conserved domain with many mammalian proteins. *Cell* . 1996. 84, 115–125.
- Kuszak JR, Macsai MS, Bloom KJ, Rae JL, Weinstein RS.** Cell-to-cell fusion of lens fiber cells in situ: correlative light, scanning electron microscopic, and freeze-fracture studies. *J Ultrastruct Res*. 1985 Dec;93(3):144-60.
- Lee JT, Lu N.** Targeted mutagenesis of *Tsix* leads to nonrandom X inactivation. *Cell*. 1999 Oct 1;99(1):47-57.
- Lochrie MA, Mendel JE, Sternberg PW, Simon MI.** Homologous and unique G protein α subunits in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell Regul*. 1991.2, 135–154.
- Luz JG, Hassig CA, Pickle C, Godzik A, Meyer BJ, Wilson IA.** XOL-1, primary determinant of sexual fate in *C. elegans*, is a GHMP kinase family member and a structural prototype for a class of developmental regulators. *Genes Dev*. 2003 Apr 15;17(8):977-90.
- Madl JE, Herman RK.** Polyploids and sex determination in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1979 Oct;93(2):393-402.
- Maloo JN, Kenyon C.** The Hox gene *lin-39* is required during *C. elegans* vulval induction to select the outcome of Ras signaling. *Development*. 1998 Jan;125(2):181-90.
- Manning DR.** Evidence mounts for receptor-independent activation of heterotrimeric G proteins normally *in vivo*: positioning of the mitotic spindle in *C. elegans*. *Sci. STKE* 2003, pe35.
- Marigo V, Davey RA, Zuo Y, Cunningham JM, Tabin CJ.** Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature*. 1996 Nov 14;384(6605):176-9.
- Marigo V, Roberts DJ, Lee SM, Tsukurov O, Levi T, Gastier JM, Epstein DJ, Gilbert DJ, Copeland NG and Seidman CE** Cloning, expression, and chromosomal location of SHH and IHH: two human homologues of the *Drosophila* segment polarity gene hedgehog. *Genomics*. 1995 Jul 1;28(1):44-51.
- Mason DA, Rabinowitz JS, Portman DS.** *dmd-3*, a doublesex-related gene regulated by tra-1, governs sex-specific morphogenesis in *C. elegans*. *Development*. 2008 Aug;135(14):2373-82.
- Mathies LD, Schvarzstein M, Morphy KM, Blleloch R, Spence AM, Kimble J.** TRA-1/GLI controls development of somatic gonadal precursors in *C. elegans*.

Development. 2004 Sep;131(17):4333-43.

McDonel P, Jans J, Peterson BK, Meyer BJ. Clustered DNA motifs mark X chromosomes for repression by a dosage compensation complex. *Nature*. 2006 Nov 30;444(7119):614-8.

McDowell KA, Hilfiker A, Lucchesi JC. Dosage compensation in *Drosophila*: the X chromosome binding of MSL-1 and MSL-2 in female embryos is prevented by the early expression of the *Sxl* gene. *Mech Dev*. 1996 Jun;57(1):113-9.

McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol*. 2003;53:1-114. Review

Mendel JE, Korswagen HC, Liu KS, Hajdu-Cronin YM, Simon MI, Plasterk, RH, Sternberg PW. Participation of the protein Go in multiple aspects of behavior in *C. elegans*. *Science*. 1995. 267, 1652–1655.

Merendino L, Guth S, Bilbao D, Martínez C, Valcárcel J. Inhibition of msl-2 splicing by Sex-lethal reveals interaction between U2AF35 and the 3' splice site *AG*. *Í*. 1999 Dec 16;402(6763):838-41.

Meyer BJ. X-chromosome dosage compensation. In WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, 2005. *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.8.1.

Miller LM, Plenefisch JD, Casson LP, Meyer BJ. *xol-1*: a gene that controls the male modes of both sex determination and X chromosome dosage compensation in *C. elegans*. *Cell*. 1988 Oct 7;55(1):167-83.

Mohler WA, Simske JS, Williams-Masson EM, Hardin JD, White JG. Dynamics and ultrastructure of developmental cell fusions in the *Caenorhabditis elegans* hypodermis. *Curr Biol*. 1998 Sep 24;8(19):1087-90.

Montell C. PLC fills a GAP in G-protein-coupled signalling. *Nat Cell Biol*. 2000 May;2(5):E82-3. Review.

Myers TR, Greenwald I. *lin-35* Rb acts in the major hypodermis to oppose ras-mediated vulval induction in *C. elegans*. *Dev Cell*. 2005 Jan;8(1):117-23.

Neves SR, Ram PT, Iyengar R. G protein pathways. *Science*. 2002. 296, 1636–1639.

Newman AP, White JG, Sternberg PW. Morphogenesis of the *C. elegans* hermaphrodite uterus. *Development*. 1996 Nov;122(11):3617-26.

Nicoll, M., Akerib, C. C. and Meyer, B. J. (1997). X-chromosome-counting mechanisms that determine nematode sex. *Nature* **388**, 200–204.

Østerlund T, Kogerman P. Hedgehog signalling: how to get from Smo to Ci and Gli. *Trends Cell Biol*. 2006 Apr;16(4):176-80.

- Parkhurst SM, Meneely PM.** Sex determination and dosage compensation: lessons from flies and worms. *Science*. 1994 May 13;264(5161):924-32.
- Paroush Z, Finley RL Jr, Kidd T, Wainwright SM, Ingham PW, Brent R, Ish-Horowicz D.** *Groucho* is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. *Cell*. 1994 Dec 2;79(5):805-15.
- Peden E, Kimberly E, Gengyo-Ando K, Mitani S, Xue X.** (2007). Control of sex-specific apoptosis in *C. elegans* by the BarH homeodomain protein CEH-30 and the transcriptional repressor UNC-37/Groucho. *Genes Dev*. **21**, 3195–3207.
- Perry MD, Li W, Trent C, Robertson B, Fire A, Hageman JM, Wood WB.** Molecular characterization of the *her-1* gene suggests a direct role in cell signaling during *Caenorhabditis elegans* sex determination. *Genes Dev*. 1993 Feb;7(2):216-28.
- Phillips CM, Wong C, Bhalla N, Carlton PM, Weiser P, Meneely PM, Dernburg AF.** HIM-8 binds to the X chromosome pairing center and mediates chromosome-specific meiotic synapsis. *Cell*. 2005 Dec 16;123(6):1051-63.
- Pires-daSilva A, Sommer RJ.** The evolution of signalling pathways in animal development. *Nat Rev Genet*. 2003 Jan;4(1):39-49. Review.
- Portman DS.** Genetic control of sex differences in *C. elegans* neurobiology and behavior. *Adv Genet*. 2007;59:1-37. Review.
- Powell JR, Jow MM, Meyer BJ.** The T-box transcription factor SEA-1 is an autosomal element of the X:A signal that determines *C. elegans* sex. *Dev. Cell*, 2005 Sep;9(3):339-49.
- Pultz MA, Baker BS.** The dual role of *hermaphrodite* in the *Drosophila* sex determination regulatory hierarchy. *Development*. 1995 Jan;121(1):99-111.
- Rhind NR, Miller LM, Kopczynski JB, Meyer BJ.** *xol-1* acts as an early switch in the *C. elegans* male/hermaphrodite decision. *Cell*. 1995 Jan 13;80(1):71-82.
- Rietveld A, Neutz S, Simons K, Eaton S.** Association of sterol- and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins with *Drosophila* raft lipid microdomains. *J Biol Chem*. 1999 Apr 23;274(17):12049-54.
- Rohatgi R, Scott MP.** Patching the gaps in Hedgehog signalling. *Nat Cell Biol*. 2007 Sep;9(9):1005-9.
- Rubin LL, de Sauvage FJ.** Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Dec;5(12):1026-33.
- Ruiz i Altaba A, Mas C, Stecca B.** The Gli code: an information nexus regulating cell fate,

- stemness and cancer. *Trends Cell Biol.* 2007 Sep;17(9):438-47.
- Schwarzstein M, Spence AM.** The *C. elegans* sex-determining GLI protein TRA-1A is regulated by sex-specific proteolysis. *Dev Cell.* 2006 Nov;11(5):733-40.
- Schwartz HT, Horvitz HR.** The *C. elegans* protein CEH-30 protects male-specific neurons from apoptosis independently of the Bcl-2 homolog CED-9. *Genes Dev.* 2007 Dec 1;21(23):3181-94.
- Sengupta P, Bargmann CI.** Cell fate specification and differentiation in the nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Genet.* 1996;18(1):73-80.
- Ségalat L, Elkes DA, Kaplan JM.** Modulation of serotonin-controlled behaviors by G_o in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 1995. 267, 1648–1651.
- Shemer G, Podbilewicz B.** LIN-39/Hox triggers cell division and represses EFF-1/fusogen-dependent vulval cell fusion. *Genes Dev.* 2002 Dec 15;16(24):3136-41.
- Shemer G, Suissa M, Kolotuev I, Nguyen KC, Hall DH, Podbilewicz B.** EFF-1 is sufficient to initiate and execute tissue-specific cell fusion in *C. elegans*. *Curr Biol.* 2004 Sep 7;14(17):1587-91.
- Simmer F, Moorman C, Van Der Linden AM, Kuijk E, Van Den Berghe PV, Srinivasan DG, Fisk RM, Xu H, and van den Heuvel S.** A complex of LIN-5 and GPR proteins regulates G protein signaling and spindle function in *C. elegans*. *Genes Dev.* 2003. 17, 1225–1239.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN.** A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* 1990 Jul 19;346(6281):240-4.
- Sinisi AA, Pasquali D, Notaro A, Bellastella A.** Sexual differentiation. *J Endocrinol Invest.* 2003;26(3 Suppl):23-8. Review.
- Skipper M, Milne CA, Hodgkin J.** Genetic and molecular analysis of *fox-1*, a numerator element involved in *Caenorhabditis elegans* primary sex determination. *Genetics.* 1999 Feb;151(2):617-31.
- Sokol SB, Kuwabara PE.** Proteolysis in *Caenorhabditis elegans* sex determination: cleavage of TRA-2A by TRA-3. *Genes Dev.* 2000 Apr 15;14(8):901-6.
- Solari F, Ahringer J.** NURD-complex genes antagonise Ras-induced vulval development in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol.* 2000 Feb 24;10(4):223-6.
- Sosnowski BA, Belote JM, McKeown M.** Sex-specific alternative splicing of RNA from the

- transformer gene results from sequence-dependent splice site blockage. *Cell*. 1989 Aug 11;58(3):449-59.
- Spence AM, Coulson A, Hodgkin J.** The product of *fem-1*, a nematode sex-determining gene, contains a motif found in cell cycle control proteins and receptors for cell-cell interactions. *Cell*. 1990 Mar 23;60(6):981-90.
- Starostina NG, Lim JM, Schvarzstein M, Wells L, Spence AM, Kipreos ET.** A CUL-2 ubiquitin ligase containing three FEM proteins degrades TRA-1 to regulate *C. elegans* sex determination. *Dev Cell*. 2007 Jul;13(1):127-39.
- Straub T, Becker PB.** Dosage compensation: the beginning and end of generalization. *Nat Rev Genet*. 2007 Jan;8(1):47-57.
- Sternberg PW, Horvitz HR.** Pattern formation during vulval development in *C. elegans*. *Cell* 1986; 44: 761–772.
- Sternberg PW.** Vulval development. *WormBook*. 2005 Jun 25:1-28.
- Sulston JE, Albertson DG, Thomson JN.** The *Caenorhabditis elegans* male: postembryonic development of nongonadal structures.. *Dev Biol*. 1980 Aug;78(2):542-76
- Sulston JE, Horvitz HR.** Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*. 1977 Mar;56(1):110-56.
- Szabó E, Hargitai B, Regos A, Tihanyi B, Barna J, Borsos E, Takács-Vellai K, Vellai T.** TRA-1/GLI controls the expression of the *Hox* gene *lin-39* during *C. elegans* vulval development. *Dev Biol*. 2009 Jun 15;330(2):339-48.
- Takács-Vellai K, Vellai T, Chen EB, Zhang Y, Guerry F, Stern MJ, Müller F.** Transcriptional control of Notch signaling by a HOX and a PBX/EXD protein during vulval development in *C. elegans*. *Dev Biol*. 2007 Feb 15;302(2):661-9.
- Taylor BJ, Vilella A, Ryner LC, Baker BS, Hall JC.** Behavioral and neurobiological implications of sex-determining factors in *Drosophila*. *Dev Genet*. 1994;15(3):275-96.
- Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW.** Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*. 2002 Apr 4;416(6880):542-5.
- Thuline HC, Norby DW.** Spontaneous occurrence of chromosome abnormality in cats. *Science*. 1961 Aug 25;134:554-5.
- Trent C, Purnell B, Gavinski S, Hageman J, Wood, WB.** Sex-specific transcriptional regulation of the *C. elegans* sex-determining gene *her-1*. *Mech. Dev*. 1991. 34, 43–56.
- Unhavaithaya Y, Shin TH, Miliaras N, Lee J, Oyama T, Mello CC.** MEP-1 and a homolog of the NURD complex component Mi-2 act together to maintain germline-soma

- distinctions in *C. elegans*. *Cell*. 2002 Dec 27;111(7):991-1002.
- Varjosalo M, Taipale J.** Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev*. 2008 Sep 15;22(18):2454-72.
- Villeneuve AM, Meyer BJ.** The role of *sdc-1* in the sex determination and dosage compensation decisions in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1990 Jan;124(1):91-114.
- von Mering C, Basler K.** Distinct and regulated activities of human Gli proteins in *Drosophila*. *Curr Biol*. 1999 Nov 18;9(22):1319-22.
- von Zelewsky T, Palladino F, Brunschwig K, Tobler H, Hajnal H, Müller F.** The *C. elegans* Mi-2 chromatin-remodelling proteins function in vulval cell fate determination. *Development*. 2000 127, 5277–5284.
- Wagers AJ, Weissman IL.** Plasticity of adult stem cells..*Cell*. 2004 Mar 5;116(5):639-48. Review.
- Wagmaister JA, Gleason JE, Eisenmann DM.** Transcriptional upregulation of the *C. elegans* *Hox* gene *lin-39* during vulval cell fate specification. *Mech Dev*. 2006 Feb;123(2):135-50.
- Wang, B.B., Müller-Immergluck, M.M., Austin, J., Robinson, N.T., Chisholm, A., Kenyon, K.** A homeotic gene cluster patterns the anteroposterior body axis of *C. elegans*. *Cell*. 1993.74, 29–42.
- Wickner W, Schekman R.** Membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol*. 2008 Jul;15(7):658-64. Review.
- Wieschaus E, Gehring W.** Clonal analysis of primordial disc cells in the early embryo of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*. 1976 Jun;50(2):249-63.
- Wilkinson HA, Greenwald I.** Spatial and temporal patterns of *lin-12* expression during *C. elegans* hermaphrodite development. *Genetics*. 1995 Oct;141(2):513-26.
- Wilson CW, Chuang PT.** New "hogs" in Hedgehog transport and signal reception. *Cell*. 2006 May 5;125(3):435-8.
- Xu XZ, Sternberg PW.** A *C. elegans* sperm TRP protein required for sperm-egg interactions during fertilization. *Cell*. 2003 Aug 8;114(3):285-97.
- Yi W, Ross J, Zarkower D.** (2000). *mab-3* is a direct *tra-1* target gene regulating diverse aspects of *C. elegans* male sexual development and behaviour. *Development* **127**, 4469–4480.
- Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG** Changing potency by spontaneous fusion.. *Nature*. 2002 Apr 4;416(6880):545-8.
- Yonker SA, Meyer BJ.** Recruitment of *C. elegans* dosage compensation proteins for gene-

- specific versus chromosome-wide repression. *Development* 2003 Dec;130(26):6519-32.
- Younger-Shepherd S, Vaessin H, Bier E, Jan LY, Jan YN.** *deadpan*, an essential pan-neural gene encoding an HLH protein, acts as a denominator in *Drosophila* sex determination. *Cell*. 1992 Sep 18;70(6):911-22.
- Zarkower, D. and Hodgkin, J.** (1992). Molecular analysis of the *C. elegans* sex-determining gene *tra-1*: a gene encoding two zinc finger proteins. *Cell* **70**, 237–249.
- Zarkower D, Hodgkin J.** Zinc fingers in sex determination: only one of the two *C. elegans* Tra-1 proteins binds DNA in vitro. *Nucleic Acids Res.* 1993 Aug 11;21(16):3691-8.
- Zarkower D.** Establishing sexual dimorphism: conservation amidst diversity? *Nat Rev Genet.* 2001 Mar;2(3):175-85.
- Zarkower, D.** (2006). Somatic sex determination. In WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.84.1
- Zhang W, Zhao Y, Tong C, Wang G, Wang B, Jia J, Jiang J.** Hedgehog-regulated Costal2-kinase complexes control phosphorylation and proteolytic processing of Cubitus interruptus. *Dev Cell*. 2005 Feb;8(2):267-78.
- Zhu AJ, Zheng L, Suyama K, Scott MP.** Altered localization of *Drosophila* Smoothened protein activates Hedgehog signal transduction. *Genes Dev.* 2003 May 15;17(10):1240-52.
- Zugasti O, Rajan J, Kuwabara PE.** The function and expansion of the *Patched*- and *Hedgehog*-related homologs in *C. elegans*. *Genome Res.* 2005 Oct;15(10):1402-10.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Dr. Vellai Tibornak a lehetőséget, hogy a tudományos műhelyének tagja lehettem. Hálával tartozom a kollégáimnak a fejlődésre motiváló légkör megteremtéséért és a szakmai segítségért. Köszönöm a barátaimnak a megértést, bátorítást és a kikapcsolódás lehetőségét. Végül ezúton is szeretném megköszönni édesanyámnak a rengeteg áldozatot és lemondást, ami a felneveléssel járt.